

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003 年 12 月 31 日 (31.12.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/001037 A1

- (51) 国際特許分類⁷: C12N 15/09, C12Q 1/68, G01N 33/50, 33/53, A61K 48/00, A61P 9/10
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/003477
- (22) 国際出願日: 2003 年 3 月 20 日 (20.03.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2002-181580 2002 年 6 月 21 日 (21.06.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 財団法人名古屋産業科学研究所 (NAGOYA INDUSTRIAL SCIENCE RESEARCH INSTITUTE) [JP/JP]; 〒460-0008 愛知県名古屋市 中区栄二丁目10番19号 Aichi (JP). 財団法人岐阜県国際バイオ研究所 (GIFU INTERNATIONAL INSTITUTE OF BIOTECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒504-0838 岐阜県 各務原市那加不動丘 1-1 Gifu (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 山田 芳司 (YAMADA, Yoshiji) [JP/JP]; 〒458-0013 愛知県名古屋市 緑区ほら貝2-82-3 グローリアス緑区ほら貝702号
- Aichi (JP). 横田 充弘 (YOKOTA, Mitsuhiro) [JP/JP]; 〒458-0812 愛知県名古屋市 緑区神の倉3-98 Aichi (JP).
- (74) 代理人: 小西 富雅, 外 (KONISHI, Tomimasa et al.); 〒460-0002 愛知県名古屋市 中区丸の内二丁目17番12号 丸の内エースビル7階 Aichi (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

WO 2004/001037 A1

(54) Title: METHOD OF DIAGNOSING RISK OF MYOCARDIAL INFARCTION

(54) 発明の名称: 心筋梗塞のリスク診断方法

(57) Abstract: It is intended to provide a means of diagnosing myocardial infarction which shows a high accuracy and a high estimation ratio. The risk of myocardial infarction is diagnosed by a method comprising the following steps: (i) the step of analyzing 2 or more polymorphisms among 10 gene polymorphisms or 5 gene polymorphisms proved as relating to myocardial infarction; (ii) the step of determining the genotype of a nucleic acid sample based on the polymorphism data obtained in the above step; and (iii) the step of determining the genetic risk of myocardial infarction from the genotype thus determined.

(57) 要約: 高精度で予知確率の高い心筋梗塞のリスクを診断する手段を提供する。以下の工程を含んでなる方法により心筋梗塞のリスク診断を行う。(i)心筋梗塞との関連が認められた10個の遺伝子多型、又は5個の遺伝子多型から二つ以上の多型を解析する工程、(ii)前記工程によって得られる多型情報から核酸試料の遺伝子型を決定する工程、及び(iii)決定された遺伝子型から心筋梗塞の遺伝的リスクを求める工程。

明 細 書

心筋梗塞のリスク診断方法

5 技術分野

本発明は心筋梗塞に関連する遺伝子を利用した検出方法に関する。詳しくは、心筋梗塞に関連する複数の遺伝子の多型を利用した検出方法及び該方法に用いられるキットに関する。本発明は、例えば心筋梗塞のリスク診断に利用できる。

10 背景技術

心筋梗塞は多因子疾患であり、個人個人の遺伝的背景とさまざまな環境因子の相互作用により発症が規定される (Marenberg ME, Risch N, Berkman LF, Floderus B, de Faire U. Genetic susceptibility to death from coronary heart disease in a study of twins. *N Engl J Med* 1994;330:1041-1046.、Nora JJ, Lortscher RH, Spangler RD, Nora AH, Kimberling WJ. Genetic-epidemiologic study of early-onset ischemic heart disease. *Circulation* 1980;61:503-508.)。一般的に心筋梗塞の発症率は高血圧・糖尿病・高脂血症などの従来危険因子の数に比例して高くなる (Nora JJ, Lortscher RH, Spangler RD, Nora AH, Kimberling WJ. Genetic-epidemiologic study of early-onset ischemic heart disease. *Circulation* 1980;61:503-508.)。これらの危険因子自体も一部は遺伝的要因により制御されているが、家族歴が独立した心筋梗塞の予知因子であることから、従来の危険因子以外にも心筋梗塞感受性因子が存在することが示唆されている (Marenberg ME, Risch N, Berkman LF, Floderus B, de Faire U. Genetic susceptibility to death from coronary heart disease in a study of twins. *N Engl J Med* 1994;330:1041-1046.)。さらに、従来の危険因子を全く持たなくても

心筋梗塞を発症する例があることも、遺伝因子との関連を示唆する。

心筋梗塞は欧米諸国において最も死亡率の高い疾患であり、たとえ致死的ではないにしても、心不全や狭心症・難治性不整脈を合併し患者の生活の質を著しく低下させるため、これを予防することが重要であることは言うまでもない。心筋梗塞を予防するための一つの方法は心筋梗塞感受性遺伝子を同定することである。連鎖解析 (Broeckel U, Hengstenberg C, Mayer B, et al. A comprehensive linkage analysis for myocardial infarction and its related risk factors. *Nature genet* 2002;30:210-214.) および候補遺伝子による関連解析 (Cambien F, Poirier O, Lecerf L, et al. Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature* 1992;359:641-644., Weiss EJ, Bray PF, Tayback M, et al. A polymorphism of a platelet glycoprotein receptor as an inherited risk factor for coronary thrombosis. *N Engl J Med* 1996;334:1090-1094., Iacoviello L, Di Castelnuovo A, De Knijff P, et al. Polymorphisms in the coagulation factor VII gene and the risk of myocardial infarction. *N Engl J Med* 1998;338:79-85., Kuivenhoven JA, Jukema JW, Zwinderman AH, et al. The role of a common variant of the cholesterol ester transfer protein gene in the progression of coronary atherosclerosis. *N Engl J Med* 1998;338:86-93.) により、心筋梗塞と関連する染色体上の遺伝子座およびいくつかの候補遺伝子群が同定された。今までにゲノム疫学的研究によりアンギオテンシン変換酵素 (Cambien F, Poirier O, Lecerf L, et al. Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature* 1992;359:641-644.), 血小板糖タンパク IIIa (Weiss EJ, Bray PF, Tayback M, et al. A polymorphism of a platelet glycoprotein rece

ptor as an inherited risk factor for coronary thrombosis. N Engl J Med 1996;334:1090-1094.)、第7血液凝固因子、コレステロールエステル移送タンパク (Kuivenhoven JA, Jukema JW, Zwinderman AH, et al. The role of a common variant of the cholesterol ester transfer protein gene in the progression of coronary atherosclerosis. N Engl J Med 1998;338:86-93.)などの遺伝子多型と心筋梗塞との関連が報告されているが、相反する報告もあり、未だ一定の結論を得るに至っていない。さらに、異なる人種では異なるゲノム多型を有するため、それぞれの人種で多型と心筋梗塞との関連についてのデータベースを構築することが重要である。

10

発明の開示

以上のように、今までに数多くの遺伝子多型と冠動脈疾患あるいは心筋梗塞との関連解析が行われてきた。しかし多くの研究についてはその意義について一定の見解は得られていない。その主な理由は多くの研究における対象集団の大きさが十分でないことと、遺伝子多型のみならず環境因子が人種間で異なっていることに起因する。さらに、たとえ心筋梗塞との関連が認められたとしても、大規模集団における解析では相対危険度（オッズ比）が低いのが一般的である。

15

本発明は以上の背景に鑑みなされたものであって、その目的は高精度で予知確率の高い心筋梗塞の遺伝的リスクを診断する手段を提供し、心筋梗塞の一次予防に貢献することである。

20

本発明者らは、以上の目的を達成するために数種類の公的データベースを用いて、冠動脈硬化、冠動脈攣縮、高血圧、糖尿病、高脂血症などとの関連が推定される71遺伝子を抜粋し、遺伝子の機能変化との関連が予想されるものなどを中心に112多型を選択した。続いて、この71遺伝子112多型に関して5000例を越える大規模関連解析を行った。その結果、心筋梗塞と関連する SNP (single nucleo

25

5 tide polymorphism) を男性で 10 個、女性で 5 個同定することに成功した。更に、これらの多型を組み合わせる用いることにより、多因子ロジスティック回帰分析の stepwise forward selection により男性では最大オッズ比 11.26、女性では最大オッズ比 88.51 を呈することが認められた。この結果から、これらの SNP の中から複数の SNP を選択し、各 SNP を解析した結果を組み合わせる用いれば、信頼性が高く、予知確率の高い心筋梗塞のリスク診断が行えるとの知見が得られた。一方で、女性において心筋梗塞との関連が認められた 5 個の SNP の中の一つについては、その多型を単独で解析することによっても極めて高いオッズ比が得られるものであった。本発明は以上の知見に基づくものであって、次の構成を提供する。

[1] 以下の工程 (a) を含んでなる、核酸試料の遺伝子型を検出する方法、

(a) 核酸試料における、以下の (1) ~ (10) からなるグループより選択される二つ以上の多型を解析する工程、

- (1) コネキシン 37 遺伝子の塩基番号 1019 位の多型、
- 15 (2) 腫瘍壊死因子 α 遺伝子の塩基番号-863 位の多型、
- (3) NADH/NADPH オキシダーゼ p22 フォックス遺伝子の塩基番号 242 位の多型、
- (4) アンジオテンシノーゲン遺伝子の塩基番号-6 位の多型、
- (5) アポリポプロテイン E 遺伝子の塩基番号-219 位の多型、
- (6) 血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ遺伝子の塩基番号 994 位の多型、
- 20 (7) アポリポプロテイン C-III 遺伝子の塩基番号-482 位の多型、
- (8) トロンボスポンジン 4 遺伝子の塩基番号 1186 位の多型、
- (9) インターロイキン 10 遺伝子の塩基番号-819 位の多型、及び
- (10) インターロイキン 10 遺伝子の塩基番号-592 位の多型。

[2] 以下の工程 (b) を含んでなる、核酸試料の遺伝子型を検出する方法、

- 25 (b) 核酸試料における、以下の (11) ~ (15) からなるグループより選択される二

つ以上の多型を解析する工程、

(11) ストロメライン 1 遺伝子の塩基番号-1171 位の多型、

(12) プラスミノーゲン活性化因子インヒビター 1 遺伝子の塩基番号-668 位の多型、

5 (13) グリコプロテイン 1b α 遺伝子の塩基番号 1018 位の多型、

(14) パラオキシナーゼ遺伝子の塩基番号 584 位の多型、及び

(15) アポリポプロテイン E 遺伝子の塩基番号 4070 位の多型。

[3] 以下の工程(c)を含んでなる、核酸試料の遺伝子型を検出する方法、

10 (c) 核酸試料における、アポリポプロテイン E 遺伝子の塩基番号 4070 位の多型を解析する工程。

[4] 以下の工程(i)~(iii)を含んでなる、心筋梗塞のリスク診断方法、

(i) 核酸試料における、以下の(1)~(10)からなるグループより選択される二つ以上の多型を解析する工程、

(1) コネキシン 37 遺伝子の塩基番号 1019 位の多型、

15 (2) 腫瘍壊死因子 α 遺伝子の塩基番号-863 位の多型、

(3) NADH/NADPH オキシダーゼ p22 フォックス遺伝子の塩基番号 242 位の多型、

(4) アンギオテンシノーゲン遺伝子の塩基番号-6 位の多型、

(5) アポリポプロテイン E 遺伝子の塩基番号-219 位の多型、

(6) 血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ遺伝子の塩基番号 994 位の多型、

20 (7) アポリポプロテイン C-III 遺伝子の塩基番号-482 位の多型、

(8) トロンボスポンジン 4 遺伝子の塩基番号 1186 位の多型、

(9) インターロイキン 10 遺伝子の塩基番号-819 位の多型、及び

(10) インターロイキン 10 遺伝子の塩基番号-592 位の多型、

(ii) 前記工程によって得られる多型情報から核酸試料の遺伝子型を決定する工
25 程、及び

(iii) 決定された遺伝子型から心筋梗塞の遺伝的リスクを求める工程。

[5] 以下の工程(iv)~(vi)を含んでなる、心筋梗塞のリスク診断方法、

(iv) 核酸試料における、以下の(11)~(15)からなるグループより選択される二つ以上の多型を解析する工程、

5 (11) ストロメライン 1 遺伝子の塩基番号-1171 位の多型、

(12) プラスミノゲン活性化因子インヒビター1 遺伝子の塩基番号-668 位の多型、

(13) グリコプロテイン 1b α 遺伝子の塩基番号 1018 位の多型、

(14) パラオキシナーゼ遺伝子の塩基番号 584 位の多型、及び

10 (15) アポリポプロテイン E 遺伝子の塩基番号 4070 位の多型、

(v) 前記工程によって得られる多型情報から核酸試料の遺伝子型を決定する工程、及び

(vi) 決定された遺伝子型から心筋梗塞の遺伝的リスクを求める工程。

[6] 以下の工程(vii)~(ix)を含んでなる、心筋梗塞のリスク診断方法、

15 (vii) 核酸試料における、アポリポプロテイン E 遺伝子の塩基番号 4070 位の多型を解析する工程、

(viii) 前記工程によって得られる多型情報から核酸試料の遺伝子型を決定する工程、及び

(ix) 決定された遺伝子型から心筋梗塞の遺伝的リスクを求める工程。

20 [7] 以下の(1)~(10)からなるグループより選択される二つ以上の核酸を含んでなる遺伝子型検出用キット、

(1) コネキシン 37 遺伝子の塩基番号 1019 位の多型を解析するための核酸、

(2) 腫瘍壊死因子 α 遺伝子の塩基番号-863 位の多型を解析するための核酸、

(3) NADH/NADPH オキシダーゼ p22 フォックス遺伝子の塩基番号 242 位の多型を

25 解析するための核酸、

(4) アンギオテンシノーゲン遺伝子の塩基番号-6 位の多型を解析するための核酸、

(5) アポリポプロテイン E 遺伝子の塩基番号-219 位の多型を解析するための核酸、

5 (6) 血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ遺伝子の塩基番号 994 位の多型を解析するための核酸、

(7) アポリポプロテイン C-III 遺伝子の塩基番号-482 位の多型を解析するための核酸、

10 (8) トロンボスポンジン 4 遺伝子の塩基番号 1186 位の多型を解析するための核酸、

(9) インターロイキン 10 遺伝子の塩基番号-819 位の多型を解析するための核酸、及び

(10) インターロイキン 10 遺伝子の塩基番号-592 位の多型を解析するための核酸。

15 [8] 以下の(11)～(15)からなるグループより選択される二つ以上の核酸を含んでなる遺伝子型検出用キット、

(11) ストロメライン 1 遺伝子の塩基番号-1171 位の多型を解析するための核酸、

20 (12) プラスミノーゲン活性化因子インヒビター-1 遺伝子の塩基番号-668 位の多型を解析するための核酸、

(13) グリコプロテイン Ib α 遺伝子の塩基番号 1018 位の多型を解析するための核酸、

(14) パラオキシナーゼ遺伝子の塩基番号 584 位の多型を解析するための核酸、及び

25 (15) アポリポプロテイン E 遺伝子の塩基番号 4070 位の多型を解析するための核酸

酸。

〔9〕 アポリポrotein E 遺伝子の塩基番号 4070 位の多型を解析するための核酸、を含んでなる遺伝子型検出用キット。

〔10〕 以下の(1)～(10)からなるグループより選択される二つ以上の核酸が
5 不溶性支持体に固定されてなる固定化核酸、

(1) コネキシン 37 遺伝子の塩基番号 1019 位の多型を解析するための核酸、

(2) 腫瘍壊死因子 α 遺伝子の塩基番号-863 位の多型を解析するための核酸、

(3) NADH/NADPH オキシダーゼ p22 フォックス遺伝子の塩基番号 242 位の多型を
解析するための核酸、

10 (4) アンギオテンシノーゲン遺伝子の塩基番号-6 位の多型を解析するための核酸、

(5) アポリポrotein E 遺伝子の塩基番号-219 位の多型を解析するための核酸、

(6) 血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ遺伝子の塩基番号 994 位の多型を
15 解析するための核酸、

(7) アポリポrotein C-III 遺伝子の塩基番号-482 位の多型を解析するための核酸、

(8) トロンボスポンジン 4 遺伝子の塩基番号 1186 位の多型を解析するための核酸、

20 (9) インターロイキン 10 遺伝子の塩基番号-819 位の多型を解析するための核酸、
及び

(10) インターロイキン 10 遺伝子の塩基番号-592 位の多型を解析するための核酸。

〔11〕 以下の(11)～(15)からなるグループより選択される二つ以上の核酸が
25 不溶性支持体に固定されてなる固定化核酸、

(11) ストロメライン 1 遺伝子の塩基番号-1171 位の多型を解析するための核酸、

(12) プラスミノーゲン活性化因子インヒビター 1 遺伝子の塩基番号-668 位の多型を解析するための核酸、

5 (13) グリコプロテイン 1b α 遺伝子の塩基番号 1018 位の多型を解析するための核酸、

(14) パラオキシナーゼ遺伝子の塩基番号 584 位の多型を解析するための核酸、及び

(15) アポリポプロテイン E 遺伝子の塩基番号 4070 位の多型を解析するための核酸。
10

[12] アポリポプロテイン E 遺伝子の塩基番号 4070 位の多型を解析するための核酸が不溶性支持体に固定されてなる固定化核酸。

図面の簡単な説明

15 図 1 は、実施例におけるスクリーニング関連解析において検討した 112 遺伝子多型をまとめた表である。

図 2 は、同じく実施例におけるスクリーニング関連解析において検討した 112 遺伝子多型をまとめた表である。

図 3 は、実施例において遺伝子型を決定するために使用されるプライマー（上
20 から順に配列番号 30、31、32、21、22、23、15、16、17、24、25、26、18、19、20、33、34、35、42、43、44）、プローブ（上から順に配列番号 59、60）及びその他の条件をまとめた表である。
図中、FITC はフルオレセインイソチオシアネートを、TxR はテキサスレッドをそれぞれ表す。

25 図 4 は、同じく実施例において遺伝子型を決定するために使用されるプライマ

ー（上から順に配列番号 27、28、29、39、40、41、36、37、38、53、54、55、56、57、58、48、49、45、46、47、50、51、52）、プローブ（上から順に配列番号 61、62、63、64）及びその他の条件をまとめた表である。図中、FITC はフルオレセインイソチオシアネート、TxR はテキサスレッドをそれぞれ表す。

図 5 は、実施例のスクリーニング関連解析における対象 909 例の背景をまとめた表である。年齢と Body mass index のデータは平均±標準偏差で表される。表中、*1 は $P=0.0278$ を、*2 は $P<0.0001$ versus controls をそれぞれ表す。

図 6 は、実施例のスクリーニング関連解析において心筋梗塞との関連が認められた遺伝子多型をまとめた表である。

図 7 は、実施例における関連解析の全対象 5061 例の背景をまとめた表である。年齢と Body mass index のデータは平均±標準偏差で表される。表中、*1 は $P=0.022$ を、*2 は $P<0.001$ を、*3 は $P=0.017$ をそれぞれ表す。

図 8 は、実施例における関連解析の全対象 5061 例において心筋梗塞との関連が認められた遺伝子多型の遺伝子型分布をまとめた表である。

図 9 は、実施例における関連解析の全対象 5061 例における遺伝子多型と心筋梗塞の多因子ロジスティック回帰分析の結果を示す表である。表中、OR はオッズ比を、CI は信頼区間をそれぞれ表す。

図 10 は、心筋梗塞と関連のある遺伝子多型における多因子ロジスティック回帰分析の stepwise forward selection method の結果を示す表である。表中、CI は信頼区間を表す。

図 11 は、男性における 5 個の組合せ遺伝子多型を用いた心筋梗塞の遺伝的リスク（発症リスク）診断の結果を示す表である。

図 12 は、女性における 5 個の組合せ遺伝子多型を用いた心筋梗塞の遺伝的リスク（発症リスク）診断の結果を示す表である。

図 1 3 は、組み合わせる遺伝子多型の数と心筋梗塞罹患のオッズ比の関係を表すグラフである。尚、(A) が男性を対象とした場合、(B) が女性を対象とした場合である。

5 発明を実施するための最良の形態

本発明の第 1 の局面は核酸試料の遺伝子型を検出する方法に関し、その一態様は以下の(1)～(10)からなるグループより選択される二つ以上の多型を解析する工程を含むことを特徴とする。また他の態様としては、以下の(11)～(15)からなるグループより選択される二つ以上の多型を解析する工程を含むことを特徴とする。

10 る。さらに他の態様としては、以下の(15)の多型を解析する工程を少なくとも含むことを特徴とする。尚、以上の工程の結果得られる多型情報から核酸試料の遺伝子型を決定することにより心筋梗塞の遺伝的リスクを求めることができる。

(1) コネキシン 37 (Connexin 37) 遺伝子の塩基番号 1019 位の多型 : 1019C→T (以下、「コネキシン 37(1019C→T)多型」ともいう)

15 (2) 腫瘍壊死因子 α 遺伝子 (Tumor necrosis factor- α) の塩基番号-863 位の多型 : -863C→A (以下、「TNF α (-863C→A)多型」ともいう)

(3) NADH/NADPH オキシダーゼ p22 フォックス (NADH/NADPH oxidase p22 phox) 遺伝子の塩基番号 242 位の多型 : 242C→T (以下、「NADH/NADPH オキシダーゼ p22 フォックス(242C→T)多型」ともいう)、

20 (4) アンギオテンシノーゲン (Angiotensinogen) 遺伝子の塩基番号-6 位の多型 : -6G→A (以下、「アンギオテンシノーゲン(-6G→A)多型」ともいう)

(5) アポリポプロテイン E (Apolipoprotein E) 遺伝子の塩基番号-219 位の多型 : -219G→T (以下、「アポ E-219(-219G→T)多型」ともいう)

(6) 血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ (Platelet-activating factor acetylhydrolase) 遺伝子の塩基番号 994 位の多型 : 994G→T (以下、「PAF アセチル

25

ヒドロラーゼ(994G→T)多型」ともいう)

(7)アポリポプロテイン C-III (Apolipoprotein C-III) 遺伝子の塩基番号-482 位の多型: -482C→T (以下、「アポ C-III(-482C→T)多型」ともいう)

(8)トロンボスポンジン 4 (Thrombospondin 4) 遺伝子の塩基番号 1186 位の多
5 型: 1186G→C (以下、「TSP4(1186G→C)多型」ともいう)

(9)インターロイキン 10 (Interleukin-10) 遺伝子の塩基番号-819 位の多型: -
819T→C (以下、「IL-10(-819T→C)多型」ともいう)

(10)インターロイキン 10 (Interleukin-10) 遺伝子の塩基番号-592 位の多型: -
-592A→C (以下、「IL-10(-592A→C)多型」ともいう)

10 (11)ストロメライシン 1 (Stromelysin-1) 遺伝子の塩基番号-1171 位の多型: -
1171/5A→6A (以下、「ストロメライシン 1(-1171/5A→6A)多型」ともいう)

(12)プラスミノゲン活性化因子インヒビター1 (Plasminogen activator inh
ibitor-1) 遺伝子の塩基番号-668 位の多型: -668/4G→5G (以下、「PAI1(-668/4G
→5G)多型」ともいう)

15 (13)グリコプロテイン Ib α (Glycoprotein Ib α) 遺伝子の塩基番号 1018 位の
多型: 1018C→T (以下、「グリコプロテイン Ib α (1018C→T)多型」ともいう)

(14)パラオキシナーゼ (Paraoxonase) 遺伝子の塩基番号 584 位の多型: 584G
→A (以下、「パラオキシナーゼ(584G→A)多型」ともいう)

(15)アポリポプロテイン E (Apolipoprotein E) 遺伝子の塩基番号 4070 位の多
20 型: 4070C→T (以下、「アポ E(4070C→T)多型」ともいう)

以上において 1019C→T のような表記は、当該塩基番号位置の多型が矢印の前又
は後の塩基である二つの遺伝子型からなることを意味する。但し、-1171/5A→6A
は塩基番号-1171 位から 3' 方向に A (アデニン) が連続して 5 個存在する遺伝子
25 型と 6 個存在する遺伝子型からなる多型を意味する。同様に、-668/4G→5G は塩

基番号-668 位から 3' 方向に G (グアニン) が連続して 4 個存在する遺伝子型と 5 個存在する遺伝子型からなる多型を意味する。

各遺伝子における塩基番号は公共のデータベースである GenBank (NCBI) に登録されている公知の配列を基準として表される。尚、配列番号 1 の塩基配列 (Accession No. M96789 : Homo sapiens connexin 37 (GJA4) mRNA, complete cds) において 1019 番目の塩基がコネキシン 37 遺伝子の 1019 位塩基に相当する。同様に配列番号 2 の塩基配列 (Accession No. L11698 : Homo sapiens tumor necrosis factor alpha gene, promoter region) において 197 番目の塩基が腫瘍壊死因子 α 遺伝子の -863 位塩基に相当し、配列番号 3 の塩基配列 (Accession No. M61107 : Homo sapiens cytochrome b light chain (CYBA) gene, exons 3 and 4) において 684 番目の塩基が NADH/NADPH オキシダーゼ p22 フォックス遺伝子の 242 位塩基に相当し、配列番号 4 の塩基配列 (Accession No. X15323 : H. sapiens angiotensinogen gene 5' region and exon 1) において 463 番目の塩基がアンギオテンシノーゲン遺伝子の -6 位塩基に相当し、配列番号 5 の塩基配列 (Accession No. AF055343 : Homo sapiens apolipoprotein E (APOE) gene, 5' regulatory region, partial sequence) において 801 番目の塩基がアポリポプロテイン E 遺伝子の -219 位塩基に相当し、配列番号 6 の塩基配列 (Accession No. U20157 : Human platelet-activating factor acetylhydrolase mRNA, complete cds) において 996 番目の塩基が血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ遺伝子の 994 位塩基に相当し、配列番号 7 の塩基配列 (Accession No. X13367 : Human DNA for apolipoprotein C-III 5'-flank) において 936 番目の塩基がアポリポプロテイン C-III 遺伝子の -482 位塩基に相当し、配列番号 8 の塩基配列 (Accession No. Z19585 : H. sapiens mRNA for thrombospondin-4) において 1186 番目の塩基がトロンボスポンジン 4 遺伝子の 1186 位塩基に相当し、配列番号 9 の塩基配列

(Accession No. Z30175 : H.sapiens IL-10 gene for interleukin 10 (promoter))
において 455 番目の塩基がインターロイキン 10 遺伝子の-819 位塩基に、682 番目
の塩基が-592 位塩基にそれぞれ相当し、配列番号 1 0 の塩基配列 (Accession No.
U43511 : Homo sapiens stromelysin-1 gene, promoter region) において 698 番
5 目の塩基がストロメライシン 1 遺伝子の-1171 位塩基に相当し、配列番号 1 1 の
塩基配列 (Accession No. X13323 : Human gene for plasminogen activator
inhibitor 1 (PAI-1) 5'-flank and exon 1) において 131 番目の塩基がプラスミ
ノーゲン活性化因子インヒビター 1 遺伝子の-668 位塩基に相当し、配列番号 1 2
の塩基配列 (Accession No. J02940 : Human platelet glycoprotein Ib alpha chain
10 mRNA, complete cds) において 524 番目の塩基がグリコプロテイン Ib α 遺伝子の
1018 位塩基に相当し、配列番号 1 3 の塩基配列 (Accession No. M63012 : H.sapiens
serum paraoxonase (PON) mRNA, complete cds) において 584 番目の塩基がバラ
オキシナーゼ遺伝子の 584 位塩基に相当し、配列番号 1 4 の塩基配列 (Accession
No. M10065 : Human apolipoprotein E (epsilon-4 allele) gene, complete cds)
15 において 4070 番目の塩基がアポリポプロテイン E 遺伝子の 4070 位塩基に相当す
る。

本発明において「多型を解析する」とは、解析対象の遺伝子多型について核酸試
料がどのような遺伝子型を有するかを調べることを意味し、多型が存在する位置
20 の塩基（塩基配列）を調べることと同義である。典型的には、コネキシン 37 (101
9C \rightarrow T) 多型の解析を例に採れば、核酸試料におけるコネキシン 37 の遺伝子型が T
T (1019 位塩基が両アレル共に T のホモ接合体)、CT (1019 位塩基が C のアレルと
T のアレルとのヘテロ接合体)、及び CC (1019 位塩基が両アレル共に C のホモ接
合体) の中のいずれであるかを調べることを意味する。

上記の(1)～(10)の多型は、後述の実施例で示されるように、日本人男性を対象とした解析において心筋梗塞の遺伝的リスクの判定に利用することが特に有効と認められた多型である。従って、これらの多型を解析対象とすることは、男性、特に日本人男性を被験者とするときにより高精度で予知確率の高い診断を可能とする。

同様に(11)～(15)の多型は、後述の実施例で示されるように、日本人女性を対象とした解析において心筋梗塞の遺伝的リスクの判定に利用することが有効と認められた多型である。従って、これらの多型を解析対象とすることは、女性、特に日本人女性を被験者とするときにより高精度で予知確率の高い診断を可能とする。これらの多型の中でも(15)の多型については、後述の実施例で示されるように、それを解析することにより極めて高いオッズ比で心筋梗塞の遺伝的リスクを判別できることが確認された。従って、この多型を単独で解析することによっても高精度かつ予知確率の高い心筋梗塞の遺伝的リスクを判定することが可能である。勿論、この(15)の多型の解析に加えて、(11)～(14)から選択されるいずれか又は複数の多型の解析を組み合わせ実施し、遺伝子型の検出或は心筋梗塞の遺伝的リスクの診断を行うこともできる。

ここで、原則的には解析する多型の数の増加に比例して核酸試料の遺伝子型がより細かく分類され、これによって一層予知確率の高い心筋梗塞の遺伝的リスクの診断を行うことができる。かかる見地から、上記の(1)～(10)の多型の中でより多くの多型を解析して遺伝子型を検出することが好ましい。従って、(1)～(10)のすべての多型を解析することが最も好ましい。九つ以下の多型を組み合わせ遺伝子型の検出を行う場合には、後述の実施例で示されるオッズ比の高い多型を優先的に選択して用いることが好ましい。例えば八つの多型を組み合わせ用い

るのであれば、オッズ比の高い順から九つ、即ち(1)、(3)、(5)、(6)、(7)、(8)、
(9)及び(10)を選択することが好ましい。同様に、例えば七つの多型を組み合わせ
て用いるのであれば(1)、(3)、(5)、(6)、(8)、(9)及び(10)を選択することが好
ましい。同様に、例えば六つの多型を組み合わせるのであれば(1)、(5)、(6)、
5 (8)、(9)及び(10)を選択することが好ましい。同様に、例えば五つの多型を組み
合わせて用いるのであれば(1)、(5)、(6)、(8)及び(9)を選択することが好まし
い。

(11)～(15)の多型から選択される二つ以上の多型を解析する場合も同様に、こ
10 れらすべての多型、即ち五つの多型を解析することが最も好ましい。四つ以下の
多型を組み合わせる遺伝子型の検出を行う場合には、後述の実施例で示されるオ
ッズ比の高い多型を優先的に選択して用いることが好ましい。例えば四つの多型
を組み合わせるのであれば、オッズ比の高い順から四つ、即ち(11)、(12)、
(14)、及び(15)を選択することが好ましい。同様に、例えば三つの多型を組み合
15 わせて用いるのであれば(11)、(12)、及び(15)を選択することが好ましい。同様
に、例えば二つの多型を組み合わせるのであれば(11)及び(15)を選択する
ことが好ましい。

各遺伝子多型を解析する方法は特に限定されるものではなく、例えばアリル特
20 異的プライマー（及びプローブ）を用い、PCR法による増幅、及び増幅産物の多
型を蛍光又は発光によって解析する方法や、PCR(polymerase chain reaction)法
を利用したPCR-RFLP(restriction fragment length polymorphism: 制限酵素断
片長多型)法、PCR-SSCP(single strand conformation polymorphism: 単鎖高次構
造多型)法(Orita, M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 86, 2766-2770
25 (1989)等)、PCR-SSO(specific sequence oligonucleotide: 特異的配列オリゴヌ

クレオチド)法、PCR-SSO法とドットハイブリダイゼーション法を組み合わせた ASO(allele specific oligonucleotide:アレル特異的オリゴヌクレオチド)ハイブリダイゼーション法(Saiki, Nature, 324, 163-166(1986)等)、又は TaqMan-PCR法(Livak, KJ, Genet Anal, 14, 143(1999), Morris, T. et al., J. Clin. Microbiol., 34, 2933(1996))、Invader法(Lyamichev V et al., Nat Biotechnol, 17, 292(1999))、プライマー伸長法を用いた MALDI-TOF/MS(matrix)法(Haff LA, Smirnov IP, Genome Res 7, 378(1997))、RCA(rolling cycle amplification)法(Lizardi PM et al., Nat Genet 19, 225(1998))、DNAチップ又はマイクロアレイを用いた方法(Wang DG et al., Science 280, 1077(1998)等)、プライマー伸長法、サザン
10 プロットハイブリダイゼーション法、ドットハイブリダイゼーション法(Southern, E., J. Mol. Biol. 98, 503-517(1975))等、公知の方法を採用できる。さらに、解析対象の多型部分を直接シーケンスすることにより解析してもよい。尚、これらの方法を任意に組み合わせて多型解析を行ってもよい。

15 核酸試料が少量の場合には、検出感度ないし精度の面から PCR法を利用した方法(例えば、PCR-RFLP法)により解析することが好ましい。また、PCR法又は PCR法を応用した方法などの遺伝子増幅法により核酸試料を予め増幅(核酸試料の一部領域の増幅を含む)した後、上記いずれかの解析方法を適用することもできる。

20 一方、多数の核酸試料を解析する場合には、特に、アレル特異的 PCR法、アレル特異的ハイブリダイゼーション法、TaqMan-PCR法、Invader法、プライマー伸長法を用いた MALDI-TOF/MS(matrix)法、RCA(rolling cycle amplification)法、又は DNAチップ又はマイクロアレイを用いた方法等、多数の検体を比較的短時間で解析することが可能な解析方法を用いることが好ましい。

以上の方法では、各方法に応じたプライマーやプローブ等の核酸（本発明において、「多型解析用核酸」ともいう）が使用される。多型解析用核酸の例としては、解析対象の多型を含む遺伝子において、当該多型部位を含む一定領域（部分 DNA 領域）に相補的な配列を有する核酸を挙げることができる。また、解析対象の多型を含む遺伝子において、当該多型部位を含む一定領域（部分 DNA 領域）に相補的な配列を有し、当該多型部分を含む DNA フラグメントを特異的に増幅できるように設計された核酸（プライマー）を挙げることができる。このような核酸としては、例えばコネキシン 37 遺伝子の 1019 位の多型が解析対象の場合には、1019 位の塩基が C（シトシン）であるコネキシン 37 遺伝子の 1019 位塩基を含む部分 DNA 領域に相補的な配列を有する核酸、又は 1019 位の塩基が T（チミン）であるコネキシン 37 遺伝子の 1019 位塩基を含む部分 DNA 領域に相補的な配列を有する核酸が該当する。

多型解析用核酸の他の具体例としては、解析対象の多型部位がいずれかの遺伝子型である場合にのみ、当該多型部位を含む部分 DNA 領域を特異的に増幅するように設計された核酸セットを挙げることができる。より具体的には、解析対象の多型部位を含む部分 DNA 領域を特異的に増幅するように設計された核酸セットであって、多型部位がいずれかの遺伝子型であるアンチセンス鎖の当該多型部位を含む部分 DNA 領域に対して特異的にハイブリダイズするセンスプライマーとセンス鎖の一部領域に対して特異的にハイブリダイズするアンチセンスプライマーからなる核酸セットを例示することができる。このような核酸セットとしては、コネキシン 37 遺伝子の 1019 位の多型が解析対象の場合には、コネキシン 37 遺伝子の 1019 位塩基を含む部分 DNA 領域を特異的に増幅するように設計された核酸セットであって、1019 位塩基が C（シトシン）であるコネキシン 37 遺伝子のアンチセンス鎖において 1019 位塩基を含む部分 DNA 領域、に対して特異的にハイブリダイ

ズするセンスプライマーとセンス鎖の一部領域に対して特異的にハイブリダイズするアンチセンスプライマーからなる核酸セット、又は 1019 位塩基が T(チミン)であるコネキシン 37 遺伝子のアンチセンス鎖において 1019 位塩基を含む部分 DNA 領域、に対して特異的にハイブリダイズするセンスプライマー、及びセンス鎖の一部領域に対して特異的にハイブリダイズするアンチセンスプライマーからなる核酸セットが該当する。ここで、増幅される部分 DNA 領域の長さはその検出に適した範囲で適宜設定され、例えば 50 bp~200 bp、好ましくは 80 bp~150 bp である。より具体的には、例えばコネキシン 37(1019C→T)多型解析用の核酸セットとして次の配列を有するものを例示できる。尚、以下の配列の下線部は多型に対応する部分を表す。また、配列中の N は A、T、C、及び G のいずれかであることを意味する。

センスプライマー

CTCAGAATGGCCAAAANCC : 配列番号 1 5、又は

15 CCTCAGAATGGCCAAAANTC : 配列番号 1 6

アンチセンスプライマー

GCAGAGCTGCTGGGACGA : 配列番号 1 7

同様に、TNF α (-863C→A)多型解析用の核酸プライマーとして次の配列を有するものを例示できる。

アンチセンスプライマー

GGCCCTGTCTTCGTTAANGG : 配列番号 1 8、又は

ATGGCCCTGTCTTCGTTAANTG : 配列番号 1 9

センスプライマー

25 CCAGGGCTATGGAAGTCGAGTATC : 配列番号 2 0

同様に、NADH/NADPH オキシダーゼ p22 フォックス (242C→T) 多型解析用の核酸プライマーとして次の配列を有するものを例示できる。

アンチセンスプライマー

5 ACCACGGCGGTCATGNGC : 配列番号 2 1、又は

ACCACGGCGGTCATGNAC : 配列番号 2 2

センスプライマー

GCAGCAAAGGAGTCCCGAGT : 配列番号 2 3

10 同様に、アンギオテンシノーゲン (-6G→A) 多型解析用の核酸プライマーとして次の配列を有するものを例示できる。

アンチセンスプライマー

CGGCAGCTTCTTCCCNCG : 配列番号 2 4、又は

CGGCAGCTTCTTCCCNIG : 配列番号 2 5

15 センスプライマー

CCACCCCTCAGCTATAAATAGG : 配列番号 2 6

同様に、アポ E (-219G→T) 多型解析用の核酸プライマーとして次の配列を有するものを例示できる。

20 センスプライマー

GAATGGAGGAGGGTGTCTNGA : 配列番号 2 7、又は

AGAATGGAGGAGGGTGTCTNIA : 配列番号 2 8

アンチセンスプライマー

CCAGGAAGGGAGGACACCTC : 配列番号 2 9

同様に、PAF アセチルヒドロラーゼ (994G→T) 多型解析用の核酸プライマーとして次の配列を有するものを例示できる。

センスプライマー

TTCTTTTGGTGGAGCAACNGT : 配列番号 3 0、又は

5 ATTCTTTTGGTGGAGCAACNIT : 配列番号 3 1

アンチセンスプライマー

TCTTACCTGAATCTCTGATCTTCA : 配列番号 3 2

同様に、アポ C-III (-482C→T) 多型解析用の核酸プライマーとして次の配列を
10 有するものを例示できる。

センスプライマー

CGGAGCCACTGATGCNCG : 配列番号 3 3、又は

CGGAGCCACTGATGCNIG : 配列番号 3 4

アンチセンスプライマー

15 TGTTTGGAGTAAAGGCACAGAA : 配列番号 3 5

同様に、TSP4 (1186G→C) 多型解析用の核酸プライマーとして次の配列を有する
ものを例示できる。

センスプライマー

20 CGAGTTGGGAACGCACNCT : 配列番号 3 6、又は

CGAGTTGGGAACGCACNGT : 配列番号 3 7

アンチセンスプライマー

GGTCTGCACTGACATTGATGAG : 配列番号 3 8

25 同様に、IL-10 (-819T→C) 多型解析用の核酸プライマーとして次の配列を有する

ものを例示できる。

センスプライマー

TACCCTTGTACAGGTGATGTANIA : 配列番号 39、又は

TACCCTTGTACAGGTGATGTANCA : 配列番号 40

5 アンチセンスプライマー

ATAGTGAGCAAACTGAGGCACA : 配列番号 41

同様に、IL-10 (-592A→C) 多型解析用の核酸プライマーとして次の配列を有するものを例示できる。

10 アンチセンスプライマー

CAGAGACTGGCTTCCTACANGA : 配列番号 42、又は

CCAGAGACTGGCTTCCTACANIA : 配列番号 43

センスプライマー

GCCTGGAACACATCCTGTGA : 配列番号 44

15

同様に、ストロメライン 1 (-1171/5A→6A) 多型解析用の核酸プライマーとして次の配列を有するものを例示できる。

センスプライマー

TTTGATGGGGGGAAAANAC : 配列番号 45、又は

20 TTGATGGGGGGAAAANCC : 配列番号 46

アンチセンスプライマー

CCTCATATCAATGTGGCCAA : 配列番号 47

同様に、PAI1 (-668/4G→5G) 多型解析用の核酸プライマーとして次の配列を有するものを例示できる。

25

センスプライマー

GGCACAGAGAGAGTCTGGACACG : 配列番号 4 8

アンチセンスプライマー

GGCCGCCTCCGATGATACA : 配列番号 4 9

5

同様に、グリコプロテイン 1b α (1018C \rightarrow T) 多型解析用の核酸プライマーとして次の配列を有するものを例示できる。

センスプライマー

CCCAGGGCTCCTGNCG : 配列番号 5 0、又は

10 CCCAGGGCTCCTGNIG : 配列番号 5 1

アンチセンスプライマー

TGAGCTTCTCCAGCTTGGGTG : 配列番号 5 2

15 同様に、パラオキシナーゼ (584G \rightarrow A) 多型解析用の核酸プライマーとして次の配列を有するものを例示できる。

センスプライマー

ACCCAAATACATCTCCCAGGANCG : 配列番号 5 3、又は

AACCCAAATACATCTCCCAGGNCT : 配列番号 5 4

アンチセンスプライマー

20 GAATGATATTGTTGCTGTGGGAC : 配列番号 5 5

同様に、アポ E (4070C \rightarrow T) 多型解析用の核酸プライマーとして次の配列を有するものを例示できる。

センスプライマー

25 CCGATGACCTGCAGAANCG : 配列番号 5 6、又は

GCCGATGACCTGCAGAANTG : 配列番号 5 7

アンチセンスプライマー

CGGCCTGGTACACTGCCAG : 配列番号 5 8

5 一方、プローブの具体例として以下のものを挙げることができる。

アポ C-III (-482C→T) 多型解析用プローブとして

AGCCACTGATGCNCGGTCT : 配列番号 5 9、又は

AGCCACTGATGCNTGGTCT : 配列番号 6 0。

10 IL-10 (-819T→C) 多型解析用プローブとして

GTACAGGTGATGTANATCTCTGTG : 配列番号 6 1、又は

GTACAGGTGATGTANCATCTCTGTG : 配列番号 6 2。

PAI1 (-668/4G→5G) 多型解析用プローブとして

15 TGGACACGTGGGGGAGTCAG : 配列番号 6 3、又は

TGGACACGTGGGGGAGTCAGC : 配列番号 6 4。

以上の核酸プライマー、核酸プローブは単なる一例であって、核酸プライマー
であれば目的の増幅反応を支障なく行える限度において、他方核酸プローブであ
20 れば目的のハイブリダイゼーション反応を支障なく行える限度において一部の塩
基配列に改変が施されたものであってもよい。ここでの「一部の改変」とは、塩基
の一部が欠失、置換、挿入及び／又は付加されていることを意味する。改変にか
かる塩基数は、例えば 1～7 個、好ましくは 1～5 個、更に好ましくは、1～3 個で
ある。尚、このような改変は、原則として多型部位に対応する塩基以外の部分に
25 において行われる。ただし、解析対象の多型がストロメライシン 1 (-1171/5A→6A)

多型又は PA11(-668/4G→5G)多型の場合には、多型部位に対応する塩基の一部を
改変して得られる核酸をプライマー又はプローブとして用いることも可能である。

5 多型解析用核酸（プローブ、プライマー）には、解析方法に応じて適宜 DNA 断
片又は RNA 断片が用いられる。多型解析用核酸の塩基長はそれぞれの機能が発揮
される長さであればよく、プライマーとして用いられる場合の塩基長の例として
は 10～50bp 程度、好ましくは 15～40bp 程度、更に好ましくは 15～30bp 程度であ
る。

10 尚、プライマーとして用いられる場合には増幅対象に特異的にハイブリダイズ
し、目的の DNA フラグメントを増幅することができる限り鑄型となる配列に対し
て多少のミスマッチがあってもよい。プローブの場合も同様に、検出対象の配列
と特異的なハイブリダイズが行える限り、検出対象の配列に対して多少のミスマ
ッチがあってもよい。ミスマッチの程度としては、1～数個、好ましくは 1～5
個、更に好ましくは 1～3 個である。

15 多型解析用核酸（プライマー、プローブ）はホスホジエステル法など公知の方
法によって合成することができる。尚、多型解析用核酸の設計、合成等に関して
は成書（例えば、Molecular Cloning, Third Edition, Cold Spring Harbor
Laboratory Press, New York）を参考にすることができる。

20 本発明における多型解析用核酸を予め標識物質で標識しておくことができる。
このような標識化核酸を用いることにより、例えば増幅産物の標識量を指標とし
て多型の解析を行うことができる。また、多型を構成する各遺伝子型の遺伝子に
おける部分 DNA 領域をそれぞれ特異的に増幅するように設計された 2 種類のプラ
イマーを互いに異なる標識物質で標識しておけば、増幅産物から検出される標識
25 物質及び標識量によって核酸試料の遺伝子型を判別できる。このような標識化プ

ライマーを用いた検出方法の具体例としては、多型を構成する各遺伝子型のセンス鎖にそれぞれ特異的にハイブリダイズする２種類の核酸プライマー（アリル特異的センスプライマー）をフルオレセインイソチシアネートとテキサスレッドでそれぞれ標識し、これら標識化プライマーとアンチセンス鎖に特異的にハイブリダイズするアンチセンスプライマーとを用いて多型部位を含む部分 DNA 領域を増幅し、得られた増幅産物における各蛍光物質の標識量を測定して多型を検出する方法を挙げることができる。尚、ここでのアンチセンスプライマーを例えばビオチンで標識しておけば、ビオチンとアビジンとの特異的な結合を利用して増幅産物の分離を行うことができる。

10

多型解析用核酸の標識に用いられる標識物質としては ^{32}P などの放射性同位元素、フルオレセインイソチシアネート、テトラメチルローダミンイソチシアネート、テキサスレッドなどの蛍光物質を例示でき、標識方法としてはアルカリフォスファターゼ及び T4 ポリヌクレオチドキナーゼを用いた 5' 末端標識法、T4 DNA ポリメラーゼや Klenow 断片を用いた 3' 末端標識法、ニックトランスレーション法、ランダムプライマー法 (Molecular Cloning, Third Edition, Chapter 9, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York) などを例示できる。

15

以上の多型解析用核酸を不溶性支持体に固定化した状態で用いることもできる。

20

固定化に使用する不溶性支持体をチップ状、ビーズ状などに加工しておけば、これら固定化核酸を用いて多型の解析をより簡便に行うことができる。

核酸試料は、被験者の血液、皮膚細胞、粘膜細胞、毛髪等から公知の抽出方法、精製方法を用いて調製することができる。多型解析対象の遺伝子を含むものであれば、任意の長さのゲノム DNA を核酸試料として用いることができる。また、必

25

ずしも解析対象の遺伝子のすべてが一の核酸上に存在する核酸試料を用いる必要はない。即ち、本発明の核酸試料としては、解析対象の遺伝子のすべてが一の核酸上に存在しているもの、解析対象の遺伝子が二以上の核酸上に分かれて存在しているもののいずれをも用いることができる。尚、核酸試料において解析対象の

5 遺伝子が完全な状態（即ち、遺伝子の全長が存在する状態）でなくとも、少なくとも解析される多型部位が存在している限りにおいて断片的、部分的な状態であってもよい。

各遺伝子多型の解析は遺伝子多型ごとに、又は複数若しくは全部を同時に行う。

10 前者の場合としては、例えば被験者から得た核酸試料を解析対象の多型の数に合わせて分注し、各多型の解析を個別に行う。後者の場合としては、例えば DNA チップまたはマイクロアレイによって行うことができる。尚、ここでいう同時とは解析過程のすべての操作が同時に行われることのみを意味するのではなく、一部の操作（例えば、核酸増幅操作、プローブのハイブリダイズ、又は検出）が同時

15 に行われる場合も含む。

解析対象の遺伝子の転写産物である mRNA を利用して各遺伝子の多型を解析することもできる。例えば、被験者の血液、尿等から解析対象である遺伝子の mRNA を抽出、精製した後、ノーザンブロット法 (Molecular Cloning, Third Edition,

20 7.42, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York)、ドットブロット法 (Molecular Cloning, Third Edition, 7.46, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York)、RT-PCR 法 (Molecular Cloning, Third Edition, 8.46, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York)、DNA チップ (DNA アレイ) を用いた方法などを実行することにより、mRNA を出発材料として多型解析を行うことができる。

さらに、上記の多型の中でアミノ酸の変化を伴うものについては、解析対象の遺伝子の発現産物を用いて多型解析を行うこともできる。この場合、多型部位に対応するアミノ酸を含んでいる限り、部分タンパク質、部分ペプチドであっても解析用試料として用いることができる。

5

このような遺伝子の発現産物を用いて解析する方法としては、多型部位のアミノ酸を直接分析する方法、又は立体構造の変化を利用して免疫学的に分析する方法などが挙げられる。前者としては、周知のアミノ酸配列分析法（エドマン法を利用した方法）を用いることができる。後者としては、多型を構成するいずれかの遺伝子型を有する遺伝子の発現産物に特異的な結合活性を有するモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体を用いた、ELISA法（酵素結合免疫吸着定量法）、ラジオイムノアッセイ、免疫沈降法、免疫拡散法等などを用いることができる。

10

15

以上説明した本発明の検出方法を実行することにより得られる多型情報は、心筋梗塞の遺伝的リスクの診断に利用することができる。即ち、本発明は以上の検出方法によって得られる多型情報から核酸試料の遺伝子型を決定する工程、及び決定された核酸試料の遺伝子型から遺伝的リスクを求める工程を含んでなる、心筋梗塞のリスク診断方法も提供する。ここでの遺伝子型の決定は、典型的には、

20

検出対象の多型に関して核酸試料の両アレルがいずれの遺伝子型をそれぞれ有するかを決定することである。コネキシン 37 (1019C→T) 多型が検出対象である場合を例に採れば、典型的には核酸試料におけるコネキシン 37 の遺伝子型が TT (1019 位塩基が両アレル共に T のホモ接合体)、CT (1019 位塩基が C のアレルと T のアレルとのヘテロ接合体)、及び CC (1019 位塩基が両アレル共に C のホモ接合体)、

25

の中のいずれであるかを決定することである。

後述の実施例で得られた結果を考慮すれば、高精度かつ予知確率の高い心筋梗塞の遺伝的リスクの診断を可能とするために、例えばコネキシン 37 (1019C→T) 多型であれば核酸試料の遺伝子型が TT 又は CT のいずれかであるか、それとも CC であるかが決定される。同様に、TNF α (-863C→A) 多型であれば AA 又は CA のいずれかであるか、それとも CC であるか、NADH/NADPH オキシダーゼ p22 フォックス (242C→T) 多型であれば TT 又は CT のいずれかであるか、それとも CC であるか、アンギオテンシノーゲン (-6G→A) 多型であれば AA であるか、それとも GA 又は GG のいずれかであるか、アポ E-219 (-219G→T) 多型であれば TT であるか、それとも GT 又は GG のいずれかであるか、PAF アセチルヒドロラーゼ (994G→T) 多型であれば TT 又は GT のいずれかであるか、それとも GG であるか、アポ C-III (-482C→T) 多型であれば TT であるか、それとも CT 又は CC のいずれかであるか、TSP4 (1186G→C) 多型であれば CC 又は GC のいずれかであるか、それとも GG であるか、IL-10 (-819T→C) 多型であれば CC であるか、それとも CT 又は TT のいずれかであるか、IL-10 (-592A→C) 多型であれば CC であるか、それとも CA 又は AA のいずれかであるか、ストロメライシン I (-1171/5A→6A) 多型であれば 6A/6A 又は 5A/6A のいずれかであるか、それとも 5A/5A であるか、PAI1 (-668/4G→5G) 多型であれば 5G/5G 又は 4G/5G のいずれかであるか、それとも 4G/4G であるか、グリコプロテイン Ib α (1018C→T) 多型であれば TT であるか、それとも CT 又は CC のいずれかであるか、パラオキシナーゼ (584G→A) 多型であれば AA であるか、それとも GA 又は GG のいずれかであるか、アポ E (4070C→T) 多型であれば TT であるか、それとも CT 又は C のいずれかであるかが決定される。

心筋梗塞の遺伝的リスクを診断することにより、将来的に心筋梗塞を罹患するおその程度（発症し易さ）、即ち発症リスク（発症脆弱性）が予測され、また遺

伝子型という客観的指標に基づいて心筋梗塞の認定や病状の把握を行うことが可能となる。換言すれば、本発明の診断方法によって心筋梗塞の発症リスクの評価、心筋梗塞に罹患していることの認定、又は症状の把握を行うことができる。中でも発症リスクの評価を行えることは臨床上極めて有意義である。発症リスクを事前に知るとは心筋梗塞の一次予防に貢献し、適切な予防措置を講じることを可能とするからである。

本発明の診断方法によって得られる情報は、適切な治療法の選択や、予後の改善、患者の QOL（クオリティー・オブ・ライフ）の向上、又は発症リスクの低減などに利用することができる。

10

本発明の診断方法を定期的に行うことにより、心筋梗塞の発症リスク等をモニターすることができる。このようなモニターの結果、ある外的因子（環境因子、薬剤の投与など）と発症リスク等の増加との間に相関関係が認められれば、当該外的因子を危険因子と認定し、この情報を基に発症リスク等の低減を図ることが可能と考えられる。

15

本発明で得られる心筋梗塞の発症に関連する遺伝情報を利用して、心筋梗塞の治療（予防的処置を含む）を行うことができる。例えば、本発明の診断方法を実施した結果、解析対象の多型が心筋梗塞の発症リスクを高める遺伝子型であった場合に、発症リスクの低い遺伝子型を有する遺伝子を生体内に導入して発現させれば、当該遺伝子が発現することによって症状の軽減、発症の抑制、発症リスクの軽減などを期待できる。発症リスクの高い遺伝子型を有する遺伝子の mRNA に対するアンチセンス鎖を導入し、当該 mRNA の発現を抑制する方法によっても、同様の治療効果が期待される。

20

25

遺伝子又はアンチセンス鎖の導入は、例えば、遺伝子導入用プラスミド又はウイルスベクターを用いた方法、エレクトロポレーション(Potter, H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81, 7161-7165(1984))、超音波マイクロバブル(Lawrie, A., et al. Gene Therapy 7, 2023-2027 (2000))、リポフェクション(Felgner, P.L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84, 7413-7417(1984))、マイクロインジェクション(Graessmann, M. & Graessmann, A., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73, 366-370(1976))等の方法により行うことができる。これらの方法を利用して、所望の遺伝子などを生体に対して直接的に導入(in vivo 法)又は間接的に導入(ex vivo 法)することができる。

10

本発明の第2の局面は、上述した本発明の検出方法又は診断方法に使用されるキット(遺伝子型検出用キット、又は心筋梗塞診断用キット)を提供する。かかるキットには、上記の(1)～(10)の多型からなるグループより選択される二つ以上の多型を解析するための核酸(多型解析用核酸)が含まれる。又は上記の(11)～(15)の多型からなるグループより選択される二つ以上の多型を解析するための核酸(多型解析用核酸)が含まれる。更に他の態様としては、上記の(15)の多型を解析するための核酸が含まれてキットが構成される。

15

多型解析用核酸は、それが適用される解析方法(上述したアリル特異的核酸等を用いたPCR法を利用する方法、PCR-RFLP法、PCR-SSCP、TaqMan-PCR法、Invader法等)において、解析対象の多型部分を含むDNA領域又はそれに対応するmRNAを特異的に増幅できるもの(プライマー)又は特異的に検出できるもの(プローブ)として設計される。以下に、本発明において提供されるキットの具体例を示す。

20

以下の(1)～(10)からなるグループより選択される二つ以上の核酸を含んでな

25

る遺伝子型検出用キット、

(1) 1019 位塩基が C であるコネキシン 37 遺伝子の 1019 位塩基を含む部分 DNA 領域に相補的な配列を有する核酸、又は 1019 位塩基が T であるコネキシン 37 遺伝子の 1019 位塩基を含む部分 DNA 領域に相補的な配列を有する核酸、

5 (2) -863 位塩基が C である腫瘍壊死因子 α 遺伝子の -863 位塩基を含む部分 DNA 領域に相補的な配列を有する核酸、又は -863 位塩基が A である腫瘍壊死因子 α 遺伝子の -863 位塩基を含む部分 DNA 領域に相補的な配列を有する核酸、

(3) 242 位塩基が C である NADH/NADPH オキシダーゼ p22 フォックス遺伝子の 242 位塩基を含む部分 DNA 領域に相補的な配列を有する核酸、又は 242 位塩基が T
10 である腫瘍壊死因子 α 遺伝子の 242 位塩基を含む部分 DNA 領域に相補的な配列を有する核酸、

(4) -6 位塩基が G であるアンジオテンシノーゲン遺伝子の -6 位塩基を含む部分 DNA 領域に相補的な配列を有する核酸、又は -6 位塩基が A であるアンジオテンシノーゲン遺伝子の -6 位塩基を含む部分 DNA 領域に相補的な配列を有する核酸、

15 (5) -219 位塩基が G であるアポリポプロテイン E 遺伝子の -219 位塩基を含む部分 DNA 領域に相補的な配列を有する核酸、又は -219 位塩基が T であるアポリポプロテイン E 遺伝子の -219 位塩基を含む部分 DNA 領域に相補的な配列を有する核酸、

(6) 994 位塩基が G である血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ遺伝子の 994 位塩基を含む部分 DNA 領域に相補的な配列を有する核酸、又は 994 位塩基が T である血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ遺伝子の 994 位塩基を含む部分 DNA
20 領域に相補的な配列を有する核酸、

(7) -482 位塩基が C であるアポリポプロテイン C-III 遺伝子の -482 位塩基を含む部分 DNA 領域に相補的な配列を有する核酸、又は -482 位塩基が T であるアポリポプロテイン C-III 遺伝子の -482 位塩基を含む部分 DNA 領域に相補的な配列を有
25 する核酸、

(8) 1186 位塩基が G であるトロンボスポンジン 4 遺伝子の 1186 位塩基を含む部分 DNA 領域に相補的な配列を有する核酸、又は 1186 位塩基が C であるトロンボスポンジン 4 遺伝子の 1186 位塩基を含む部分 DNA 領域に相補的な配列を有する核酸、

5 (9) -819 位塩基が T であるインターロイキン 10 遺伝子の -819 位塩基を含む部分 DNA 領域に相補的な配列を有する核酸、又は -819 位塩基が C であるインターロイキン 10 遺伝子の -819 位塩基を含む部分 DNA 領域に相補的な配列を有する核酸、及び

(10) -592 位塩基が A であるインターロイキン 10 遺伝子の -592 位塩基を含む部分 DNA 領域に相補的な配列を有する核酸、又は -592 位塩基が C であるインターロイキン 10 遺伝子の -592 位塩基を含む部分 DNA 領域に相補的な配列を有する核酸。

10 以上では、(1)～(10)からなるグループから二つ以上の核酸を選択してキットを構成しているが、(1)～(10)の二つ以上を任意に選択してグループとし、かかるグループから二つ以上の核酸を選択してキットを構成してもよい。例えば、(1)、(5) (6)、(8)、(9)及び(10)からなるグループ（後述の実施例においてオッズ比が 1 以上の多型を解析するための核酸）より二つ以上の核酸を選択してキットを構成し

15 たり、(1)、(5)、(6)、(8)及び(9)からなるグループ（後述の実施例においてオッズ比が上位 5 位までの多型を解析するための核酸）より二つ以上の核酸を選択してキットを構成することができる。

20 以下の(11)～(15)からなるグループより選択される二つ以上の核酸を含んでなる遺伝子型検出用キット、

(11) -1171 位から 3' 方向に A が 5 個連続して存在するストロメライシン 1 遺伝子の該配列部分を含む部分 DNA 領域に相補的な配列を有する核酸、又は -1171 位から 3' 方向に A が 6 個連続して存在するストロメライシン 1 遺伝子の該配列部分

25 を含む部分 DNA 領域に相補的な配列を有する核酸、

(12)-668 位から 3' 方向に連続して 4 個の G が存在するプラスミノーゲン活性化因子インヒビター 1 遺伝子の該配列部分を含む部分 DNA 領域に相補的な配列を有する核酸、又は -668 位から 3' 方向に連続して 5 個の G が存在するプラスミノーゲン活性化因子インヒビター 1 遺伝子の該配列部分を含む部分 DNA 領域に相補的な配列を有する核酸、

(13) 1018 位塩基が C であるグリコプロテイン 1b α 遺伝子の 1018 位塩基を含む部分 DNA 領域に相補的な配列を有する核酸、又は 1018 位塩基が T であるグリコプロテイン 1b α 遺伝子の 1018 位塩基を含む部分 DNA 領域に相補的な配列を有する核酸、

10 (14) 584 位塩基が G であるパラオキシナーゼ遺伝子の 584 位塩基を含む部分 DNA 領域に相補的な配列を有する核酸、又は 584 位塩基が A であるパラオキシナーゼ遺伝子の 584 位塩基を含む部分 DNA 領域に相補的な配列を有する核酸、及び

(15) 4070 位塩基が C であるアポリポプロテイン E 遺伝子の 4070 位塩基を含む部分 DNA 領域に相補的な配列を有する核酸、又は 4070 位塩基が T であるアポリポ
15 プロテイン E 遺伝子の 4070 位塩基を含む部分 DNA 領域に相補的な配列を有する核酸。

以上では、(11)～(15)からなるグループから二つ以上の核酸を選択してキットを構成しているが、(11)～(15)の二つ以上を任意に選択してグループとし、かかるグループから二つ以上の核酸を選択してキットを構成してもよい。例えば、
20 1)、(12)、(14)及び(15)からなるグループ（後述の実施例においてオッズ比が 1 以上の多型を解析するための核酸）より二つ以上の核酸セットを選択してキットを構成したり、(11)、(12)及び(15)からなるグループ（後述の実施例においてオッズ比が上位 3 位までの多型を解析するための核酸）より二つ以上の核酸を選択してキットを構成することができる。

以下の核酸を含んでなる遺伝子型検出用キット、

4070 位塩基が C であるアポリポプロテイン E 遺伝子の 4070 位塩基を含む部分 DNA 領域に相補的な配列を有する核酸、又は 4070 位塩基が T であるアポリポプロテイン E 遺伝子の 4070 位塩基を含む部分 DNA 領域に相補的な配列を有する核酸。

5

以下の (1)～(10) からなるグループより選択される二つ以上の核酸セットを含んでなる遺伝子型検出用キット、

(1) 核酸試料中のコネキシン 37 遺伝子の 1019 位塩基が C である場合にのみ、該コネキシン 37 遺伝子の 1019 位塩基を含む部分 DNA 領域を特異的に増幅するように設計された核酸セット、又は核酸試料中のコネキシン 37 遺伝子の 1019 位塩基が T である場合にのみ、該コネキシン 37 遺伝子の 1019 位塩基を含む部分 DNA 領域を特異的に増幅するように設計された核酸セット、

(2) 核酸試料中の腫瘍壊死因子 α 遺伝子の -863 位塩基が C である場合にのみ、該腫瘍壊死因子 α 遺伝子の -863 位塩基を含む部分 DNA 領域を特異的に増幅するように設計された核酸セット、又は核酸試料中の腫瘍壊死因子 α 遺伝子の -863 位塩基が A である場合にのみ、該腫瘍壊死因子 α 遺伝子の -863 位塩基を含む部分 DNA 領域を特異的に増幅するように設計された核酸セット、

(3) 核酸試料中の NADH/NADPH オキシダーゼ p22 フォックス遺伝子の 242 位塩基が C である場合にのみ、該 NADH/NADPH オキシダーゼ p22 フォックス遺伝子の 242 位塩基を含む部分 DNA 領域を特異的に増幅するように設計された核酸セット、又は核酸試料中の NADH/NADPH オキシダーゼ p22 フォックス遺伝子の 242 位塩基が T である場合にのみ、該 NADH/NADPH オキシダーゼ p22 フォックス遺伝子の 242 位塩基を含む部分 DNA 領域を特異的に増幅するように設計された核酸セット、

(4) 核酸試料中のアンギオテンシノーゲン遺伝子の -6 位塩基が G である場合にのみ、該アンギオテンシノーゲン遺伝子の -6 位塩基を含む部分 DNA 領域を特異的

25

に増幅するように設計された核酸セット、又は核酸試料中のアンギオテンシノーゲン遺伝子の-6 位塩基が A である場合にのみ、該アンギオテンシノーゲン遺伝子の-6 位塩基を含む部分 DNA 領域を特異的に増幅するように設計された核酸セット、

(5) 核酸試料中のアポリポプロテイン E 遺伝子の-219 位塩基が G である場合にのみ、該アポリポプロテイン E 遺伝子の-219 位塩基を含む部分 DNA 領域を特異的に増幅するように設計された核酸セット、又は核酸試料中のアポリポプロテイン E 遺伝子の-219 位塩基が T である場合にのみ、該アポリポプロテイン E 遺伝子の-219 位塩基を含む部分 DNA 領域を特異的に増幅するように設計された核酸セット、

(6) 核酸試料中の血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ遺伝子の 994 位塩基が G である場合にのみ、該血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ遺伝子の 994 位塩基を含む部分 DNA 領域を特異的に増幅するように設計された核酸セット、又は核酸試料中の血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ遺伝子の 994 位塩基が T である場合にのみ、該血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ遺伝子の 994 位塩基を含む部分 DNA 領域を特異的に増幅するように設計された核酸セット、

(7) 核酸試料中のアポリポプロテイン C-III 遺伝子の-482 位塩基が C である場合にのみ、該アポリポプロテイン C-III 遺伝子の-482 位塩基を含む部分 DNA 領域を特異的に増幅するように設計された核酸セット、又は核酸試料中のアポリポプロテイン C-III 遺伝子の-482 位塩基が T である場合にのみ、該アポリポプロテイン C-III 遺伝子の-482 位塩基を含む部分 DNA 領域を特異的に増幅するように設計された核酸セット、

(8) 核酸試料中のトロンボスポンジン 4 遺伝子の 1186 位塩基が G である場合にのみ、該トロンボスポンジン 4 遺伝子の 1186 位塩基を含む部分 DNA 領域を特異的に増幅するように設計された核酸セット、又は核酸試料中のトロンボスポンジン 4 遺伝子の 1186 位塩基が C である場合にのみ、該トロンボスポンジン 4 遺伝子の 1186 位塩基を含む部分 DNA 領域を特異的に増幅するように設計された核酸セット、

(9)核酸試料中のインターロイキン 10 遺伝子の-819 位塩基が T である場合にのみ、該インターロイキン 10 遺伝子の-819 位塩基を含む部分 DNA 領域を特異的に増幅するように設計された核酸セット、又は核酸試料中のインターロイキン 10 遺伝子の-819 位塩基が C である場合にのみ、該インターロイキン 10 遺伝子の-819 位塩基を含む部分 DNA 領域を特異的に増幅するように設計された核酸セット、及び

(10)核酸試料中のインターロイキン 10 遺伝子の-592 位塩基が A である場合にのみ、該インターロイキン 10 遺伝子の-592 位塩基を含む部分 DNA 領域を特異的に増幅するように設計された核酸セット、又は核酸試料中のインターロイキン 10 遺伝子の-592 位塩基が C である場合にのみ、該インターロイキン 10 遺伝子の-592 位塩基を含む部分 DNA 領域を特異的に増幅するように設計された核酸セット。

以上では、(1)～(10)からなるグループから二つ以上の核酸セットを選択してキットを構成しているが、(1)～(10)の二つ以上を任意に選択してグループとし、かかるグループから二つ以上の核酸セットを選択してキットを構成してもよい。例えば、(1)、(5)、(6)、(8)、(9)及び(10)からなるグループ（後述の実施例においてオッズ比が 1 以上の多型を解析するための核酸セット）より二つ以上の核酸セットを選択してキットを構成したり、(1)、(5)、(6)、(8)及び(9)からなるグループ（後述の実施例においてオッズ比が上位 5 位までの多型を解析するための核酸セット）より二つ以上の核酸セットを選択してキットを構成することができる。

以下の(11)～(15)からなるグループより選択される二つ以上の核酸セットを含んでなる遺伝子型検出用キット、

(11)核酸試料中のストロメライシン 1 遺伝子において-1171 位から 3' 方向に A が 5 個連続して存在する場合にのみ、該ストロメライシン 1 遺伝子の該配列部分を含む部分 DNA 領域を特異的に増幅するように設計された核酸セット、又は核酸

試料中のストロメライシン 1 遺伝子において-1171 位から 3' 方向に A が 6 個連続して存在する場合にのみ、該ストロメライシン 1 遺伝子の該配列部分を含む部分 DNA 領域を特異的に増幅するように設計された核酸セット、

(12)核酸試料中のプラスミノージェン活性化因子インヒビター 1 遺伝子において
5 -668 位から 3' 方向に G が 4 個連続して存在する場合にのみ、プラスミノージェン活性化因子インヒビター 1 遺伝子の該配列部分を含む部分 DNA 領域を特異的に増幅するように設計された核酸セット、又は核酸試料中のプラスミノージェン活性化因子インヒビター 1 遺伝子において-668 位から 3' 方向に G が 5 個連続して存在する場合にのみ、該プラスミノージェン活性化因子インヒビター 1 遺伝子の該配列部分
10 を含む部分 DNA 領域を特異的に増幅するように設計された核酸セット、

(13)核酸試料中のグリコプロテイン 1b α 遺伝子の 1018 位塩基が C である場合にのみ、該グリコプロテイン 1b α 遺伝子の 1018 位塩基を含む部分 DNA 領域を特異的に増幅するように設計された核酸セット、又は核酸試料中のグリコプロテイン 1b α 遺伝子の 1018 位塩基が T である場合にのみ、該グリコプロテイン 1b α 遺
15 伝子の 1018 位塩基を含む部分 DNA 領域を特異的に増幅するように設計された核酸セット、

(14)核酸試料中のパラオキシナーゼ遺伝子の 584 位塩基が G である場合にのみ、該パラオキシナーゼ遺伝子の 584 位塩基を含む部分 DNA 領域を特異的に増幅するように設計された核酸セット、又は核酸試料中のパラオキシナーゼ遺伝子の 584
20 位塩基が A である場合にのみ、該パラオキシナーゼ遺伝子の 584 位塩基を含む部分 DNA 領域を特異的に増幅するように設計された核酸セット、及び

(15)核酸試料中のアポリポプロテイン E 遺伝子の 4070 位塩基が C である場合にのみ、該アポリポプロテイン E 遺伝子の 4070 位塩基を含む部分 DNA 領域を特異的に増幅するように設計された核酸セット、又は核酸試料中のアポリポプロテイン
25 E 遺伝子の 4070 位塩基が T である場合にのみ、該アポリポプロテイン E 遺伝子の

4070 位塩基を含む部分 DNA 領域を特異的に増幅するように設計された核酸セット。

以上では、(11)～(15)からなるグループから二つ以上の核酸セットを選択してキットを構成しているが、(11)～(15)の二つ以上を任意に選択してグループとし、かかるグループから二つ以上の核酸セットを選択してキットを構成してもよい。

- 5 例えば、(11)、(12)、(14)及び(15)からなるグループ（後述の実施例においてオッズ比が 1 以上の多型を解析するための核酸セット）より二つ以上の核酸セットを選択してキットを構成したり、(11)、(12)及び(15)からなるグループ（後述の実施例においてオッズ比が上位 3 位までの多型を解析するための核酸セット）より二つ以上の核酸セットを選択してキットを構成することができる。

10

以下の核酸セットを含んでなる遺伝子型検出用キット、

- 核酸試料中のアポリポプロテイン E 遺伝子の 4070 位塩基が C である場合にのみ、
該アポリポプロテイン E 遺伝子の 4070 位塩基を含む部分 DNA 領域を特異的に増幅
するように設計された核酸セット、又は核酸試料中のアポリポプロテイン E 遺伝
15 子の 4070 位塩基が T である場合にのみ、該アポリポプロテイン E 遺伝子の 4070
位塩基を含む部分 DNA 領域を特異的に増幅するように設計された核酸セット。

以下の(1)～(10)からなるグループより選択される二つ以上の核酸セットを含んでなる遺伝子型検出用キット、

- 20 (1)コネキシシン 37 遺伝子の 1019 位塩基を含む部分 DNA 領域を特異的に増幅するように設計された核酸セットであって、1019 位塩基が C であるコネキシシン 37 遺伝子において 1019 位塩基を含む部分 DNA 領域、に対して特異的にハイブリダイズするセンスプライマー及び／又は 1019 位塩基が T であるコネキシシン 37 遺伝子において 1019 位塩基を含む部分 DNA 領域、に対して特異的にハイブリダイズするセ
25 ンスプライマーと、コネキシシン 37 遺伝子の一部領域に対して特異的にハイブリダ

イズするアンチセンスプライマーと、からなる核酸セット、

(2) 腫瘍壊死因子 α 遺伝子の-863 位塩基を含む部分 DNA 領域を特異的に増幅するように設計された核酸セットであって、-863 位塩基が C である腫瘍壊死因子 α 遺伝子において-863 位塩基を含む部分 DNA 領域、に対して特異的にハイブリダイ

5 ズするアンチセンスプライマー及び／又は-863 位塩基が A である腫瘍壊死因子 α 遺伝子において-863 位塩基を含む部分 DNA 領域、に対して特異的にハイブリダイズするアンチセンスプライマーと、腫瘍壊死因子 α 遺伝子の一部領域に対して特異的にハイブリダイズするセンスプライマーと、からなる核酸セット、

(3) NADH/NADPH オキシダーゼ p22 フォックス遺伝子の 242 位塩基を含む部分 DN
10 A 領域を特異的に増幅するように設計された核酸セットであって、242 位塩基が C である NADH/NADPH オキシダーゼ p22 フォックス遺伝子において-863 位塩基を含む部分 DNA 領域、に対して特異的にハイブリダイズするアンチセンスプライマー及び／又は 242 位塩基が T である NADH/NADPH オキシダーゼ p22 フォックス遺伝子において 242 位塩基を含む部分 DNA 領域、に対して特異的にハイブリダイズする
15 アンチセンスプライマーと、NADH/NADPH オキシダーゼ p22 フォックス遺伝子の一部領域に対して特異的にハイブリダイズするセンスプライマーと、からなる核酸セット、

(4) アンギオテンシノーゲン遺伝子の-6 位塩基を含む部分 DNA 領域を特異的に増幅するように設計された核酸セットであって、-6 位塩基が G であるアンギオ
20 ンシノーゲン遺伝子において-6 位塩基を含む部分 DNA 領域、に対して特異的にハイブリダイズするアンチセンスプライマー及び／又は-6 位塩基が A であるアンギオテンシノーゲン遺伝子において-6 位塩基を含む部分 DNA 領域、に対して特異的にハイブリダイズするアンチセンスプライマーと、アンギオテンシノーゲン遺伝子の一部領域に対して特異的にハイブリダイズするセンスプライマーと、から
25 る核酸セット、

(5) アポリポプロテイン E 遺伝子の -219 位塩基を含む部分 DNA 領域を特異的に増幅するように設計された核酸セットであって、-219 位塩基が G であるアポリポプロテイン E 遺伝子において -219 位塩基を含む部分 DNA 領域、に対して特異的にハイブリダイズするセンスプライマー及び／又は -219 位塩基が T であるアポリポ
5 プロテイン E 遺伝子において -219 位塩基を含む部分 DNA 領域、に対して特異的にハイブリダイズするセンスプライマーと、アポリポプロテイン E 遺伝子の一部領域に対して特異的にハイブリダイズするアンチセンスプライマーと、からなる核酸セット、

(6) 血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ遺伝子の 994 位塩基を含む部分 DNA
10 領域を特異的に増幅するように設計された核酸セットであって、994 位塩基が G である血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ遺伝子において 994 位塩基を含む部分 DNA 領域、に対して特異的にハイブリダイズするセンスプライマー及び／又は 994 位塩基が T である血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ遺伝子において 994 位塩基を含む部分 DNA 領域、に対して特異的にハイブリダイズするセンスプ
15 ライマーと、血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ遺伝子の一部領域に対して特異的にハイブリダイズするアンチセンスプライマーと、からなる核酸セット、

(7) アポリポプロテイン C-III 遺伝子の -482 位塩基を含む部分 DNA 領域を特異的に増幅するように設計された核酸セットであって、-482 位塩基が C であるアポリポプロテイン C-III 遺伝子において -482 位塩基を含む部分 DNA 領域、に対して
20 特異的にハイブリダイズするセンスプライマー及び／又は -482 位塩基が T であるアポリポプロテイン C-III 遺伝子において -482 位塩基を含む部分 DNA 領域、に対して特異的にハイブリダイズするセンスプライマーと、アポリポプロテイン C-III 遺伝子の一部領域に対して特異的にハイブリダイズするアンチセンスプライマーと、からなる核酸セット、

(8) トロンボスポンジン 4 遺伝子の 1186 位塩基を含む部分 DNA 領域を特異的に

増幅するように設計された核酸セットであって、1186 位塩基が G であるトロンボスポンジン 4 遺伝子において 1186 位塩基を含む部分 DNA 領域、に対して特異的にハイブリダイズするセンスプライマー及び／又は 1186 位塩基が C であるトロンボスポンジン 4 遺伝子において 1186 位塩基を含む部分 DNA 領域、に対して特異的に
5 ハイブリダイズするセンスプライマーと、トロンボスポンジン 4 遺伝子の一部領域に対して特異的にハイブリダイズするアンチセンスプライマーと、からなる核酸セット、

(9) インターロイキン 10 遺伝子の -819 位塩基を含む部分 DNA 領域を特異的に増幅するように設計された核酸セットであって、-819 位塩基が T であるインターロイキン 10 遺伝子において -819 位塩基を含む部分 DNA 領域、に対して特異的にハイブリダイズするセンスプライマー及び／又は 1186 位塩基が C であるインターロイキン 10 遺伝子において -819 位塩基を含む部分 DNA 領域、に対して特異的にハイブリダイズするセンスプライマーと、インターロイキン 10 遺伝子の一部領域に対して特異的にハイブリダイズするアンチセンスプライマーと、からなる核酸セ
10 ャット、及び
15

(10) インターロイキン 10 遺伝子の -592 位塩基を含む部分 DNA 領域を特異的に増幅するように設計された核酸セットであって、-592 位塩基が A であるインターロイキン 10 遺伝子において -592 位塩基を含む部分 DNA 領域、に対して特異的にハイブリダイズするアンチセンスプライマー及び／又は -592 位塩基が C であるインターロイキン 10 遺伝子において -592 位塩基を含む部分 DNA 領域、に対して特異的にハイブリダイズするアンチセンスプライマーと、インターロイキン 10 遺伝子
20 の一部領域に対して特異的にハイブリダイズするセンスプライマーと、からなる核酸セット。

以上では、(1)～(10) からなるグループから二つ以上の核酸セットを選択してキ
25 ャットを構成しているが、(1)～(10) の二つ以上を任意に選択してグループとし、か

かるグループから二つ以上の核酸セットを選択してキットを構成してもよい。例えば、(1)、(5)、(6)、(8)、(9)及び(10)からなるグループ（後述の実施例においてオッズ比が1以上の多型を解析するための核酸セット）より二つ以上の核酸セットを選択してキットを構成したり、(1)、(5)、(6)、(8)及び(9)からなるグループ（後述の実施例においてオッズ比が上位5位までの多型を解析するための核酸セット）より二つ以上の核酸セットを選択してキットを構成することができる。

以下の(11)～(15)からなるグループより選択される二つ以上の核酸セットを含んでなる遺伝子型検出用キット、

- 10 (11)ストロメライシン1遺伝子の-1171位における多型部分を含む部分DNA領域を特異的に増幅するように設計された核酸セットであって、-1171位から3'方向にAが5個連続して存在するストロメライシン1遺伝子において当該配列部分を含む部分DNA領域、に対して特異的にハイブリダイズするセンスプライマー及び／又は-1171位から3'方向にAが6個連続して存在するストロメライシン1遺
15 伝子において当該配列部分を含む部分DNA領域、に対して特異的にハイブリダイズするセンスプライマーと、ストロメライシン1遺伝子の一部領域に対して特異的にハイブリダイズするアンチセンスプライマーと、からなる核酸セット、

- (12)プラスミノージェン活性化因子インヒビター1遺伝子の-668位における多型部分を含む部分DNA領域を特異的に増幅するように設計された一組のプライマー
20 と、並びに-668位から3'方向にGが4個連続して存在するプラスミノージェン活性化因子インヒビター1遺伝子において該配列部分を含む部分DNA領域、に対して特異的にハイブリダイズするプローブ及び／又は-668位から3'方向にGが5個連続して存在するプラスミノージェン活性化因子インヒビター1遺伝子において該配列部分を含む部分DNA領域、に対して特異的にハイブリダイズするプローブと、
25 からなる核酸セット、

(13)グリコプロテイン 1b α 遺伝子の 1018 位塩基を含む部分 DNA 領域を特異的に増幅するように設計された核酸セットであって、1018 位塩基が C であるグリコプロテイン 1b α 遺伝子において 1018 位塩基を含む部分 DNA 領域、に対して特異的にハイブリダイズするセンスプライマー及び／又は 1018 位塩基が T であるグリコ
5 プロテイン 1b α 遺伝子において 1018 位塩基を含む部分 DNA 領域、に対して特異的にハイブリダイズするセンスプライマーと、グリコプロテイン 1b α 遺伝子の一部領域に対して特異的にハイブリダイズするアンチセンスプライマーと、からなる核酸セット、

(14)パラオキシナーゼ遺伝子の 584 位塩基を含む部分 DNA 領域を特異的に増幅
10 するように設計された核酸セットであって、584 位塩基が G であるパラオキシナーゼ遺伝子において 584 位塩基を含む部分 DNA 領域、に対して特異的にハイブリダイズするセンスプライマー及び／又は 584 位塩基が A であるパラオキシナーゼ遺伝子において 584 位塩基を含む部分 DNA 領域、に対して特異的にハイブリダイズするセンスプライマーと、パラオキシナーゼ遺伝子の一部領域に対して特異的
15 にハイブリダイズするアンチセンスプライマーと、からなる核酸セット、及び

(15)アポリポプロテイン E 遺伝子の 4070 位塩基を含む部分 DNA 領域を特異的に増幅するように設計された核酸セットであって、4070 位塩基が C であるアポリポ
20 プロテイン E 遺伝子において 4070 位塩基を含む部分 DNA 領域、に対して特異的にハイブリダイズするセンスプライマー及び／又は 4070 位塩基が T であるアポリポプロテイン E 遺伝子において 4070 位塩基を含む部分 DNA 領域、に対して特異的にハイブリダイズするセンスプライマーと、アポリポプロテイン E 遺伝子の一部領域に対して特異的にハイブリダイズするアンチセンスプライマーと、からなる核酸セット。

以上では、(11)～(15)からなるグループから二つ以上の核酸セットを選択して
25 キットを構成しているが、(11)～(15)の二つ以上を任意に選択してグループとし、

かかるグループから二つ以上の核酸セットを選択してキットを構成してもよい。
例えば、(11)、(12)、(14)及び(15)からなるグループ（後述の実施例においてオ
ッズ比が1以上の多型を解析するための核酸セット）より二つ以上の核酸セット
を選択してキットを構成したり、(11)、(12)及び(15)からなるグループ（後述の
5 実施例においてオッズ比が上位3位までの多型を解析するための核酸セット）よ
り二つ以上の核酸セットを選択してキットを構成することができる。

以下の核酸セットを含んでなる遺伝子型検出用キット、

アポリポプロテインE遺伝子の4070位塩基を含む部分DNA領域を特異的に増幅
10 するように設計された核酸セットであって、4070位塩基がCであるアポリポプロ
テインE遺伝子において4070位塩基を含む部分DNA領域、に対して特異的にハイ
ブリダイズするセンスプライマー及び／又は4070位塩基がTであるアポリポプロ
テインE遺伝子において4070位塩基を含む部分DNA領域、に対して特異的にハイ
ブリダイズするセンスプライマーと、アポリポプロテインE遺伝子の一部領域に
15 対して特異的にハイブリダイズするアンチセンスプライマーと、からなる核酸セ
ット。

以下の(1)～(10)からなるグループより選択される二つ以上の核酸セットを含
んでなる遺伝子型検出用キット、

20 (1)1019位塩基がCであるコネキシン37遺伝子のアンチセンス鎖において101
9位塩基に対応する塩基を含む部分領域、に対して特異的にハイブリダイズし且
つ第1の標識物質で標識された第1核酸と、1019位塩基がTであるコネキシン3
7遺伝子のアンチセンス鎖において1019位塩基に対応する塩基を含む部分領域、
に対して特異的にハイブリダイズし且つ第2の標識物質で標識された第2核酸と、
25 及びコネキシン37遺伝子のセンス鎖の一部領域に対して特異的にハイブリダイ

ズし且つ前記第 1 核酸／又は前記第 2 核酸とともに使用されてコネキシン 37 遺伝子の 1019 位塩基を含む部分 DNA 領域を特異的に増幅することが可能な第 3 核酸と、からなる核酸セット、

(2)-863 位塩基が C である腫瘍壊死因子 α 遺伝子のセンス鎖において-863 位塩基を含む部分領域、に対して特異的にハイブリダイズし且つ第 1 の標識物質で標識された第 1 核酸と、-863 位塩基が A である腫瘍壊死因子 α 遺伝子のセンス鎖において-863 位塩基を含む部分領域、に対して特異的にハイブリダイズし且つ第 2 の標識物質で標識された第 2 核酸と、及び腫瘍壊死因子 α 遺伝子のアンチセンス鎖の一部領域に対して特異的にハイブリダイズし且つ前記第 1 核酸／又は前記第 2 核酸とともに使用されて腫瘍壊死因子 α 遺伝子の-863 位塩基を含む部分 DNA 領域を特異的に増幅することが可能な第 3 核酸と、からなる核酸セット、

(3)242 位塩基が C である NADH/NADPH オキシダーゼ p22 フォックス遺伝子のセンス鎖において 242 位塩基を含む部分領域、に対して特異的にハイブリダイズし且つ第 1 の標識物質で標識された第 1 核酸と、242 位塩基が T である NADH/NADPH オキシダーゼ p22 フォックス遺伝子のセンス鎖において 242 位塩基を含む部分領域、に対して特異的にハイブリダイズし且つ第 2 の標識物質で標識された第 2 核酸と、及び NADH/NADPH オキシダーゼ p22 フォックス遺伝子のアンチセンス鎖の一部領域に対して特異的にハイブリダイズし且つ前記第 1 核酸／又は前記第 2 核酸とともに使用されて NADH/NADPH オキシダーゼ p22 フォックス遺伝子の 242 位塩基を含む部分 DNA 領域を特異的に増幅することが可能な第 3 核酸と、からなる核酸セット、

(4)-6 位塩基が G であるアンギオテンシノーゲン遺伝子のセンス鎖において-6 位塩基を含む部分領域、に対して特異的にハイブリダイズし且つ第 1 の標識物質で標識された第 1 核酸と、-6 位塩基が A であるアンギオテンシノーゲン遺伝子のセンス鎖において-6 位塩基を含む部分領域、に対して特異的にハイブリダイズし

且つ第 2 の標識物質で標識された第 2 核酸と、及びアンギオテンシノーゲン遺伝子のアンチセンス鎖の一部領域に対して特異的にハイブリダイズし且つ前記第 1 核酸／又は前記第 2 核酸とともに使用されてアンギオテンシノーゲン遺伝子の-6 位塩基を含む部分 DNA 領域を特異的に増幅することが可能な第 3 核酸と、からなる核酸セット、

(5)-219 位塩基が G であるアポリポプロテイン E 遺伝子のアンチセンス鎖において-219 位塩基に対応する塩基を含む部分領域、に対して特異的にハイブリダイズし且つ第 1 の標識物質で標識された第 1 核酸と、-219 位塩基が T であるアポリポプロテイン E 遺伝子のアンチセンス鎖において-219 位塩基に対応する塩基を含む部分領域、に対して特異的にハイブリダイズし且つ第 2 の標識物質で標識された第 2 核酸と、及びアポリポプロテイン E 遺伝子のセンス鎖の一部領域に対して特異的にハイブリダイズし且つ前記第 1 核酸／又は前記第 2 核酸とともに使用されてアポリポプロテイン E 遺伝子の-219 位塩基を含む部分 DNA 領域を特異的に増幅することが可能な第 3 核酸と、からなる核酸セット、

(6)994 位塩基が G である血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ遺伝子のアンチセンス鎖において 994 位塩基に対応する塩基を含む部分領域、に対して特異的にハイブリダイズし且つ第 1 の標識物質で標識された第 1 核酸と、994 位塩基が T である血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ遺伝子のアンチセンス鎖において 994 位塩基に対応する塩基を含む部分領域、に対して特異的にハイブリダイズし且つ第 2 の標識物質で標識された第 2 核酸と、及び血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ遺伝子のセンス鎖の一部領域に対して特異的にハイブリダイズし且つ前記第 1 核酸／又は前記第 2 核酸とともに使用されて血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ遺伝子の 994 位塩基を含む部分 DNA 領域を特異的に増幅することが可能な第 3 核酸と、からなる核酸セット、

(7)-482 位塩基が C であるアポリポプロテイン C-III 遺伝子のアンチセンス鎖

において-482 位塩基に対応する塩基を含む部分領域、に対して特異的にハイブリダイズする第 1 核酸と、-482 位塩基が T であるアポリポプロテイン C-III 遺伝子のアンチセンス鎖において-482 位塩基に対応する塩基を含む部分領域、に対して特異的にハイブリダイズする第 2 核酸と、アポリポプロテイン C-III 遺伝子のセンス鎖の一部領域に対して特異的にハイブリダイズし且つ前記第 1 核酸／又は前記第 2 核酸とともに使用されてアポリポプロテイン C-III 遺伝子の-482 位塩基を含む部分 DNA 領域を特異的に増幅することが可能な第 3 核酸と、前記第 1 核酸及び前記第 3 核酸を用いて増幅された核酸に対して特異的にハイブリダイズする第 4 核酸と、並びに前記第 2 核酸及び前記第 3 核酸を用いて増幅された核酸に対して特異的にハイブリダイズする第 5 核酸と、からなる核酸セット、

(8) 1186 位塩基が G であるトロンボスポンジン 4 遺伝子のアンチセンス鎖において 1186 位塩基に対応する塩基を含む部分領域、に対して特異的にハイブリダイズし且つ第 1 の標識物質で標識された第 1 核酸と、1186 位塩基が C であるトロンボスポンジン 4 遺伝子のアンチセンス鎖において 1186 位塩基に対応する塩基を含む部分領域、に対して特異的にハイブリダイズし且つ第 2 の標識物質で標識された第 2 核酸と、及びトロンボスポンジン 4 遺伝子のセンス鎖の一部領域に対して特異的にハイブリダイズし且つ前記第 1 核酸／又は前記第 2 核酸とともに使用されてトロンボスポンジン 4 遺伝子の 1186 位塩基を含む部分 DNA 領域を特異的に増幅することが可能な第 3 核酸と、からなる核酸セット、

(9) -819 位塩基が T であるインターロイキン 10 遺伝子のアンチセンス鎖において-819 位塩基に対応する塩基を含む部分領域、に対して特異的にハイブリダイズする第 1 核酸と、-819 位塩基が C であるインターロイキン 10 遺伝子のアンチセンス鎖において-819 位塩基に対応する塩基を含む部分領域、に対して特異的にハイブリダイズする第 2 核酸と、及びインターロイキン 10 遺伝子のセンス鎖の一部領域に対して特異的にハイブリダイズし且つ前記第 1 核酸／又は前記第 2 核酸と

ともに使用されてインターロイキン 10 遺伝子の-819 位塩基を含む部分 DNA 領域を特異的に増幅することが可能な第 3 核酸と、前記第 1 核酸及び前記第 3 核酸を用いて増幅された核酸に対して特異的にハイブリダイズする第 4 核酸と、並びに前記第 2 核酸及び前記第 3 核酸を用いて増幅された核酸に対して特異的にハイブリダイズする第 5 核酸と、からなる核酸セット、及び

(10)-592 位塩基が A であるインターロイキン 10 遺伝子のセンス鎖において-592 2 位塩基を含む部分領域、に対して特異的にハイブリダイズし且つ第 1 の標識物質で標識された第 1 核酸と、-592 位塩基が C であるインターロイキン 10 遺伝子のセンス鎖において-592 位塩基を含む部分領域、に対して特異的にハイブリダイズし且つ第 2 の標識物質で標識された第 2 核酸と、及びインターロイキン 10 遺伝子のアンチセンス鎖の一部領域に対して特異的にハイブリダイズし且つ前記第 1 核酸／又は前記第 2 核酸とともに使用されてインターロイキン 10 遺伝子の-592 位塩基を含む部分 DNA 領域を特異的に増幅することが可能な第 3 核酸と、からなる核酸セット。

以上では、(1)～(10)からなるグループから二つ以上の核酸セットを選択してキットを構成しているが、(1)～(10)の二つ以上を任意に選択してグループとし、かかるグループから二つ以上の核酸セットを選択してキットを構成してもよい。例えば、(1)、(5)、(6)、(8)、(9)及び(10)からなるグループ（後述の実施例においてオッズ比が 1 以上の多型を解析するための核酸セット）より二つ以上の核酸セットを選択してキットを構成したり、(1)、(5)、(6)、(8)及び(9)からなるグループ（後述の実施例においてオッズ比が上位 5 位までの多型を解析するための核酸セット）より二つ以上の核酸セットを選択してキットを構成することができる。

以下の(11)～(15)からなるグループより選択される二つ以上の核酸セットを含んでなる遺伝子型検出用キット、

(11)-1171 位から 3' 方向に A が 5 個連続して存在するストロメライシン 1 遺伝子のアンチセンス鎖において該配列部分に対応する配列を含む部分領域、に対して特異的にハイブリダイズし且つ第 1 の標識物質で標識された第 1 核酸と、-1171 位から 3' 方向に A が 6 個連続して存在するストロメライシン 1 遺伝子のアンチ
5 センス鎖において該配列部分に対応する配列を含む部分領域、に対して特異的にハイブリダイズし且つ第 2 の標識物質で標識された第 2 核酸と、及びストロメライシン 1 遺伝子のセンス鎖の一部領域に対して特異的にハイブリダイズし且つ前記第 1 核酸／又は前記第 2 核酸とともに使用されてストロメライシン 1 遺伝子の
-1171 位における多型部分を含む部分 DNA 領域を特異的に増幅することが可能な
10 第 3 核酸と、からなる核酸セット、

(12) プラスミノージェン活性化因子インヒビター 1 遺伝子の -668 位における多型部分を含む部分 DNA 領域を特異的に増幅するように設計された一組の核酸（第 1 核酸及び第 2 核酸）と、-668 位から 3' 方向に G が 4 個連続して存在するプラスミノージェン活性化因子インヒビター 1 遺伝子を鋳型とし且つ前記一組の核酸を用い
15 て増幅される核酸に対して特異的にハイブリダイズする第 3 核酸と、及び -668 位から 3' 方向に G が 5 個連続して存在するプラスミノージェン活性化因子インヒビター 1 遺伝子を鋳型とし且つ前記一組の核酸を用いて増幅される核酸に対して特異的にハイブリダイズする第 4 核酸と、からなる核酸セット、

(13) 1018 位塩基が C であるグリコプロテイン 1b α 遺伝子のアンチセンス鎖において 1018 位塩基に対応する塩基を含む部分領域、に対して特異的にハイブリダイズし且つ第 1 の標識物質で標識された第 1 核酸と、1018 位塩基が T であるグリコプロテイン 1b α 遺伝子のアンチセンス鎖において 1018 位塩基に対応する塩基を含む部分領域、に対して特異的にハイブリダイズし且つ第 2 の標識物質で標識
20 された第 2 核酸と、及びグリコプロテイン 1b α 遺伝子のセンス鎖の一部領域に対して特異的にハイブリダイズし且つ前記第 1 核酸／又は前記第 2 核酸とともに使
25 して特異的にハイブリダイズし且つ前記第 1 核酸／又は前記第 2 核酸とともに使

用されてグリコプロテイン lb α 遺伝子の 1018 位塩基を含む部分 DNA 領域を特異的に増幅することが可能な第 3 核酸と、からなる核酸セット、

(14) 584 位塩基が G であるパラオキシナーゼ遺伝子のアンチセンス鎖において 584 位塩基に対応する塩基を含む部分領域、に対して特異的にハイブリダイズし且つ第 1 の標識物質で標識された第 1 核酸と、584 位塩基が A であるパラオキシナーゼ遺伝子のアンチセンス鎖において 584 位塩基に対応する塩基を含む部分領域、に対して特異的にハイブリダイズし且つ第 2 の標識物質で標識された第 2 核酸と、及びパラオキシナーゼ遺伝子のセンス鎖の一部領域に対して特異的にハイブリダイズし且つ前記第 1 核酸／又は前記第 2 核酸とともに使用されてパラオキシナーゼ遺伝子の 584 位塩基を含む部分 DNA 領域を特異的に増幅することが可能な第 3 核酸と、からなる核酸セット、及び

(15) 4070 位塩基が C であるアポリポプロテイン E 遺伝子のアンチセンス鎖において 4070 位塩基に対応する塩基を含む部分領域、に対して特異的にハイブリダイズし且つ第 1 の標識物質で標識された第 1 核酸と、4070 位塩基が T であるアポリポプロテイン E 遺伝子のアンチセンス鎖において 4070 位塩基に対応する塩基を含む部分領域、に対して特異的にハイブリダイズし且つ第 2 の標識物質で標識された第 2 核酸と、及びアポリポプロテイン E 遺伝子のセンス鎖の一部領域に対して特異的にハイブリダイズし且つ前記第 1 核酸／又は前記第 2 核酸とともに使用されてアポリポプロテイン E 遺伝子の 4070 位塩基を含む部分 DNA 領域を特異的に増幅することが可能な第 3 核酸と、からなる核酸セット。

以上では、(11)～(15)からなるグループから二つ以上の核酸セットを選択してキットを構成しているが、(11)～(15)の二つ以上を任意に選択してグループとし、かかるグループから二つ以上の核酸セットを選択してキットを構成してもよい。例えば、(11)、(12)、(14)及び(15)からなるグループ（後述の実施例においてオ

25 ッズ比が 1 以上の多型を解析するための核酸セット）より二つ以上の核酸セット

を選択してキットを構成したり、(11)、(12)及び(15)からなるグループ（後述の実施例においてオッズ比が上位3位までの多型を解析するための核酸セット）より二つ以上の核酸セットを選択してキットを構成することができる。

5 以下の核酸セットを含んでなる遺伝子型検出用キット、

4070 位塩基が C であるアポリポプロテイン E 遺伝子のアンチセンス鎖において
4070 位塩基に対応する塩基を含む部分領域、に対して特異的にハイブリダイズし
且つ第 1 の標識物質で標識された第 1 核酸と、4070 位塩基が T であるアポリポ
ロテイン E 遺伝子のアンチセンス鎖において 4070 位塩基に対応する塩基を含む部
10 分領域、に対して特異的にハイブリダイズし且つ第 2 の標識物質で標識された第
2 核酸と、及びアポリポプロテイン E 遺伝子のセンス鎖の一部領域に対して特異
的にハイブリダイズし且つ前記第 1 核酸／又は前記第 2 核酸とともに使用されて
アポリポプロテイン E 遺伝子の 4070 位塩基を含む部分 DNA 領域を特異的に増幅す
ることが可能な第 3 核酸と、からなる核酸セット。

15

以上のキットにおいては、キットの使用方法に応じた一又は二以上の試薬（バッファ、反应用試薬、検出用試薬など）などを組み合わせてもよい。

以下、実施例を用いて本発明をより詳細に説明する。

20 <実施例 1> 遺伝子多型の選択

PubMed[National Center for Biological Information (NCBI)], Online Mendelian inheritance in Men (NCBI), Single Nucleotide Polymorphism (NCBI)などの数種類の公的データベースを用いて、今までに報告された遺伝子の中から血管生物学、血小板・白血球生物学、凝固線溶系、脂質・糖・その他の代謝因子などの総合的
25 側面から冠動脈硬化、冠動脈攣縮、高血圧、糖尿病、高脂血症などとの関連が推

定される 71 遺伝子を抜粋した。さらにこれらの遺伝子に存在する多型の中でプロモーター領域やエクソンに存在するもの、あるいはスプライドナー部位やアクセプター部位に位置し、遺伝子産物の機能変化との関連が予想されるものを中心に 112 多型を選択した（図 1 及び図 2）。

5

＜実施例 2＞ 遺伝子多型の決定

対象は日本人男女 5061 例（男性 3309 例、女性 1752 例）で、1994 年 7 月から 2001 年 12 月の間に 15 参加施設に外来受診または入院した症例である。心筋梗塞は 2819 例（男性 2003 例、女性 816 例）で、全例に冠動脈造影および左室造影を行った。心筋梗塞の診断は典型的な心電図変化および血清 CK、GOT、LDH の上昇により行った。さらに左室造影による壁運動異常およびそれに対応する左主幹動脈あるいは主要な冠動脈の狭窄により心筋梗塞の確定診断を行った。

対照は 2242 例（男性 1306 例、女性 936 例）で、参加施設を受診し冠動脈疾患の従来の危険因子、即ち喫煙（1 日 10 本以上）、肥満（body mass index $\geq 26 \text{ kg/m}^2$ ）、高血圧（収縮期血圧 $\geq 140 \text{ mmHg}$ または拡張期血圧 $\geq 90 \text{ mmHg}$ あるいはその両方）、糖尿病（空腹時血糖 $\geq 126 \text{ mg/dL}$ またはヘモグロビン A1c $\geq 6.5\%$ あるいはその両方）、高脂血症（血清総コレステロール $\geq 220 \text{ mg/dL}$ ）、高尿酸血症（男性では血清尿酸 $\geq 7.7 \text{ mg/dL}$ 、女性では血清尿酸 $\geq 5.5 \text{ mg/dL}$ ）の少なくとも一つを有するが冠動脈疾患を有しない症例である。これらの対照は安静時心電図が正常であり、運動負荷試験でも心筋虚血性変化は認められなかった。

それぞれの対象から静脈血 7 mL を 50 mmol/L EDTA-2Na を含むチューブに採血し、ゲノム DNA を DNA 抽出キット（Qiagen, Chatsworth, CA）を用いて抽出した。71 候補遺伝子 112 多型の決定は蛍光・発光法によるアリル特異的プライマー・プロー

ブ測定システム（東洋紡ジーンアナリシス、敦賀、日本）により行った（図 3 及び図 4）。多型部位を含む DNA 断片は 5' 末端にフルオレセインイソチオシアネート（fluorescein isothiocyanate: FITC）またはテキサスレッド（Texas red: TxR）で標識した 2 種類のアリル特異的センスプライマー（またはアンチセンスプライマー）と 5' 末端をビオチンで標識したアンチセンスプライマー（またはセンスプライマー）を用いて polymerase chain reaction (PCR) により増幅した。また別法として、多型部位を含む DNA 断片は 2 種類のアリル特異的センスプライマーと 5' 末端をビオチンで標識したアンチセンスプライマーを用いて、またはセンスプライマーと 5' 末端をビオチンで標識したアンチセンスプライマーを用いて PCR により増幅した。反応溶液（25 μ L）には 20 ng の DNA, 5 pmol の各プライマー, 0.2 mmol/L の各デオキシヌクレオシド三リン酸（dATP, dGTP, dCTP, dTTP）, 1-4 mmol/L の $MgCl_2$, 1 U の DNA ポリメラーゼ（rTaq or KODplus; 東洋紡、大阪、日本）を含み、それぞれの DNA ポリメラーゼ緩衝液を用いた。増幅プロトコールは初期変性が 95°C、5 分；35-45 cycles で変性が 95°C、30 分、アニーリングが 55-67.5°C で 30 秒、伸展が 72°C で 30 秒、そして最終伸展を 72°C で 2 分とした。

蛍光法による遺伝子型の決定では、増幅した DNA を 96 穴プレートの各ウェルでストレプトアビジン結合磁気ビーズを含む溶液中で室温でインキュベートした。このプレートを磁気スタンド上に置き、各ウェルから上清を採取し、0.01 M NaOH を含む 96 穴プレートの各ウェルに移した後、マイクロプレートリーダーにより FITC は励起・蛍光波長が 485 と 538 nm、TxR は励起・蛍光波長が 584 と 612 nm で蛍光を測定した。また発光法による遺伝子型の決定では、増幅した DNA を 0.3 M NaOH で変性させ、96 穴プレートの各ウェルの底面に固定したいずれかのアリル特異的補足プローブと 35-40%ホルムアミドを含むハイブリダイゼーション緩衝液で 37°C、30 分間ハイブリダイゼーションを行った。ウェルを十分に洗浄した

後、アルカリフォスファターゼ結合ストレプトアビジンを各ウェルに加え、プレート
を 37℃で 15 分間振騰した。ウェルを再度洗浄し、0.8 mM 2-(4-iodophenyl)-
3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium (monosodium sal
t)と 0.4 mM 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate *p*-toluidine salt を含む

5 溶液を加えた後、吸光度 450 nm を測定した。

以上の方法による遺伝子型決定の精度を確認するために、50 人の DNA サンプル
を無作為に選び PCR-制限酵素断片長多型 (PCR-RFLP) 法または PCR 産物の直接塩
基配列決定法を行った。いずれのサンプルにおいてもアリル特異的プライマー・
10 プローブ測定システムにより決定された遺伝子型は PCR-制限酵素断片長多型法
または DNA 塩基配列決定法によって決定されたものと同一であった。

尚、以下の関連解析における統計解析は次のように行った。まず、データは平
均±標準偏差で表示した。臨床データは心筋梗塞患者と対照との間でunpaired S
15 tudent's *t* test または Mann-Whitney *U* testを用いて比較した。3群間のデータ
はone-way analysis of variance またはKruskal-Wallis testならびにScheffe'
s post-hoc testにより比較した。定性的データは chi-square testで検定した。
アリル頻度は gene counting methodにより推定し、Hardy-Weinberg equilibriu
mから逸脱しているかどうかはchi-square test によって検定した。また、危険因
20 子を補正した多因子ロジスティック回帰分析を行った。心筋梗塞は従属因子とし、
年齢、body mass index (BMI)、喫煙状況 (0=非喫煙, 1=喫煙)、代謝因子 (0=高血
圧・糖尿病・高コレステロール血症・高尿酸血症の経歴なし、1 = 経歴あり)、そ
れぞれの多型の遺伝子型を独立因子とした。それぞれの遺伝子型はdominant (優
性), recessive (劣性), additive (付加) 遺伝モデルで解析し、*P*値、オッズ
25 比、95%信頼区間 (CI) を算出した。組み合わせ遺伝子型解析では、ロジスティック

回帰分析のstepwise forward selection methodによりそれぞれの遺伝子型についてのオッズ比を算出した。

<実施例 3> 心筋梗塞関連多型の選択、及び心筋梗塞診断方法の開発

5 最初に 71 遺伝子 112 多型に関するスクリーニング関連解析を男性 451 例(心筋梗塞 219 例、対照 232 例)、女性 458 例(心筋梗塞 226 例、対照 232 例)について行った。これらの症例は全体の 5061 例から無作為に選んだ。

10 以上の方法でスクリーニング関連解析を行った 909 例(男性 451 例、女性 458 例)の背景データを図 5 に示す。男性においては、年齢、BMI、および従来の冠動脈疾患の危険因子である喫煙、高血圧、糖尿病、高コレステロール血症、高尿酸血症などの頻度には心筋梗塞群と対照群との間に有意差を認めなかった。女性では、年齢、BMI、および高血圧、高コレステロール血症、高尿酸血症などの頻度には心筋梗塞群と対照群との間に有意差を認めなかったが、喫煙および糖尿病の頻度は心筋梗塞群では対照群に比べ有意に高値であった。112 多型と心筋梗塞との

15 スクリーニング関連解析において、年齢、BMI、および喫煙、高血圧、糖尿病、高コレステロール血症、高尿酸血症の頻度を補正した多因子ロジスティック回帰分析により男性で 19 個、女性で 18 個の一塩基多型 (SNP) が心筋梗塞との関連を示した(図 6)。尚、スクリーニング関連解析においてはロジスティック回帰分析において P 値 <0.1 の場合関連ありとするカテゴリーを用いた。これらの SNP の中

20 で、4 個の SNP が男女両方の心筋梗塞と関連し、他の SNP は男女いずれか一方の心筋梗塞と関連した。

次に、これらの多型の遺伝子型を残りの 4152 例(男性心筋梗塞 1784 例、男性対照 1074 例、女性心筋梗塞 590 例、女性対照 704 例)について決定した。次に、こ

25 れらの多型と心筋梗塞との関連についての大規模関連解析を合計 5061 例(男性心

筋梗塞 2003 例、男性対照 1306 例、女性心筋梗塞 816 例、女性対照 936 例)において遂行した。

大規模関連解析における全 5061 例(男性 3309、女性 1752 例)の背景データを図 7 に示す。男性では、年齢、BMI および喫煙の頻度には心筋梗塞群と対照群との間に有意差を認めなかったが、高血圧、高尿酸血症は心筋梗塞群が対照群に比べて有意に低く、糖尿病と高コレステロール血症の頻度は心筋梗塞群が対照群に比べて有意に高かった。女性では、年齢および高血圧の頻度には心筋梗塞群と対照群との間に有意差を認めなかったが、BMI および喫煙、糖尿病、高コレステロール血症、高尿酸血症の頻度は心筋梗塞群が対照群に比べて有意に高かった。男性 19 SNP、女性 18 SNP と心筋梗塞との大規模関連解析において、年齢、BMI、および喫煙、高血圧、糖尿病、高コレステロール血症、高尿酸血症の頻度を補正した多因子ロジスティック回帰分析により男性で 10 個、女性で 5 個の SNP が心筋梗塞と有意な関連を示した(dominant または recessive 遺伝モデルのいずれかが $P < 0.05$) (図 8)。これらの SNP についての遺伝子型の分布およびロジスティック回帰分析の結果を図 8 と図 9 にそれぞれ示す。

本実施例では多因子ロジスティック回帰分析の stepwise forward selection method を行った(図 10)。この方法では、図 9 に示したそれぞれの SNP の心筋梗塞との関連における P 値に基づいて dominant 又は recessive 遺伝モデルを採用した。これらの遺伝子の染色体上の遺伝子座を図 10 に示す。インターロイキン 10 (Interleukin-10) 遺伝子の -819T→C 多型と -592A→C 多型は連鎖不平衡にあった [pairwise linkage disequilibrium coefficient, D' (D/D_{\max}), of 0.406; standardized linkage disequilibrium coefficient, r , of 0.396; $P < 0.0001$, chi-square test]。腫瘍壊死因子 α (Tumor necrosis factor- α) 遺伝子と血小板活性

化因子アセチルヒドロラーゼ (platelet-activating factor acetylhydrolase) 遺伝子の遺伝子座は近接しているが、両者の多型における遺伝子型の分布には関連を認めなかった。同様に、プラスミノゲン活性化因子インヒビター1 (plasminogen activator inhibitor-1) 遺伝子とparaoxonase 遺伝子の遺伝子座は近接
5 しているが、両者の多型における遺伝子型の分布には関連を認めなかった。

Stepwise forward selection method により算出した組み合わせ遺伝子型による心筋梗塞罹患のオッズ比を、男性は図 1 1 と図 1 3 (A) に、女性は図 1 2 と図 1 3 (B) に示す。男性では、5 個の SNP (TSP4 (1186G→C) 多型、コネキシン 37 (1019
10 C→T) 多型、PAF アセチルヒドロラーゼ (994G→T) 多型、アンギオテンシノーゲン (-6G→A) 多型、腫瘍壊死因子 α (-863C→A) 多型) の組み合わせ遺伝子型により、最大のオッズ比が 4.50 となった (図 1 1、図 1 3 (A) 参照)。さらに 5 個の SNP (NADH /NADPH オキシダーゼ p22 フォックス (242C→T) 多型、アポ E (-219G→T) 多型、アポ C-III (-482C→T) 多型、IL-10 (-819T→C) 多型、IL-10 (-592A→C) 多型) を加え全部
15 で 10 個の SNP とした場合には最大のオッズ比が 11.26 となった (図 1 0 と図 1 3 (A) 参照)。女性では、5 個の SNP (アポ E (4070C→T) 多型、グリコプロテイン 1b α (1018C→T) 多型、ストロメライシン 1 (-1171/5A→6A) 多型、PAI1 (-668/4G→5G) 多型、パラオキシナーゼ (584G→A) 多型) の組み合わせ遺伝子型により、最大のオッズ比が 88.51 となった (図 1 2 と図 1 3 (B) 参照)。

20

以上のように、本発明者らは 71 候補遺伝子から選択した 112 多型と心筋梗塞との関連について検討し、5061 例の大規模関連解析により心筋梗塞と関連する SNP を男性で 10 個、女性で 5 個同定した。さらに、多因子ロジスティック回帰分析の stepwise forward selection method により男性では最大オッズ比 11.26、女性で
25 は最大オッズ比 88.51 を呈する心筋梗塞リスク診断方法 (心筋梗塞の遺伝的リス

ク診断システム)を開発した。

心筋梗塞の主な原因は動脈硬化性冠動脈疾患であり、これにより動脈内径の血行力学的な有意狭窄を生じ、血管の収縮拡張調節の異常を来し、動脈硬化巣の破裂や血栓形成を起こしやすくする。本発明者らは血管生物学、血小板・白血球生物学、凝固・線溶系、脂質・糖・その他の代謝因子などの包括的視点に基づいて71個の候補遺伝子を選択した。実際、心筋梗塞と関連した遺伝子群はその発症病態において多彩な役割を有していた。すなわち、血管生物学(connexin 37, NADH/NADPH oxidase p22 phox, and thrombospondin 4)、血管の炎症(tumor necrosis factor- α , platelet-activating factor acetylhydrolase, and interleukin-10)、高血圧(angiotensinogen)、脂質代謝(apolipoprotein E and C-III and paraoxonase)、血小板機能(glycoprotein Ib α)、基質代謝(stromelysin-1)、線溶系(PAI-1)などである(Boerma M, Forsberg L, van Zeijl L, et al. A genetic polymorphism in connexin 37 as a prognostic marker for atherosclerotic plaque development. J Intern Med 1999;246:211-218.、Inoue N, Kawashima S, Kanazawa K, Yamada S, Akita H, Yokoyama M. Polymorphism of the NADH/NADPH oxidase p22 phox gene in patients with coronary artery disease. Circulation 1998;97:135-137.、Topol EJ, McCarthy J, Gabriel S, et al. Single nucleotide polymorphisms in multiple novel thrombospondin genes may be associated with familial premature myocardial infarction. Circulation 2001;104:2641-2644.、Skoog T, van't Hooft FM, Kallin B, et al. A common functional polymorphism (C→A substitution at position -863) in the promoter region of the tumor necrosis factor- α (TNF- α) gene associated with reduced circulating level of TNF- α . Hum Mol Genet 1999;8:1443-1449.、Yamada Y, Ichihara S, Fujimura T, Yokota M. Identification of the G⁹⁹⁴→T missense

mutation in exon 9 of the plasma platelet-activating factor acetylhydrolase gene as an independent risk factor for coronary artery disease in Japanese men. *Metabolism* 1998;47:177-181.、 Koch W, Kastrati A, Bottiger C, Mehilli J, von Beckerath N, Schomig A. Interleukin-10 and tumor necrosis factor gene polymorphisms and risk of coronary artery disease and myocardial infarction. *Atherosclerosis* 2001;159:137-144.、 Inoue I, Nakajima T, Williams CS, et al. A nucleotide substitution in the promoter of human angiotensinogen is associated with essential hypertension and affects basal transcription in vitro. *J Clin Invest* 1997;99:1786-1797.、 Lambert J-C, Brousseau T, Defosse V, et al. Independent association of an APOE gene promoter polymorphism with increased risk of myocardial infarction and decreased APOE plasma concentrations — the ECTIM study. *Hum Mol Genet* 2000;9:57-61.、 Eto M, Watanabe K, Makino I. Increased frequency of apolipoprotein epsilon 2 and epsilon 4 alleles in patients with ischemic heart disease. *Clin Genet* 1989;36:183-188.、 Ruiz J, Blanche H, James RW, et al. Gln-Arg192 polymorphism of paraoxonase and coronary heart disease in type 2 diabetes. *Lancet* 1995;346:869-72.、 Murata M, Matsubara Y, Kawano K, et al. Coronary artery disease and polymorphisms in a receptor mediating shear stress-dependent platelet activation. *Circulation* 1997;96:3281-3286.、 Eriksson P, Kallin B, van't Hooft FM, Bavenholm P, Hamsten A. Allele-specific increase in basal transcription of the plasminogen-activator inhibitor 1 gene is associated with myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:1851-1855.、 Ye S, Watts GF, Mandalia S, Humphries SE, Henney AM. Preliminary report: genetic variation in the human stromelysin promoter is associated with progression of coronary atherosclerosis. *Br Heart J* 1995;73:209-215.。本発明者らは

112 遺伝子多型を 909 例において検討し、さらに 19 個の SNP を男性 2858 例で、
18 個の SNP を女性 1294 例で検討した結果、合計で 179,402 個の遺伝子型を決定
した。この遺伝子型決定数は今まで報告された遺伝子多型の関連解析の中で最大
のものである。以上の実施例で示された心筋梗塞リスク診断方法は最大オッズ比
5 が男性で 11.26、女性で 88.51 を呈し、これも今までに報告された大規模関連解
析の中で最大のオッズ比である。

心筋梗塞と関連した 15 個の SNP の中で、アポリipoprotein E (apolipoprotein E) 遺伝子の 4070T→C (Arg158Cys) 多型が女性の心筋梗塞リスクとして最大
10 のオッズ比を示した。アポリipoprotein E はカイロミクロンと超低密度リipoprotein (very low density lipoprotein: VLDL) レムナントの主要構成成分であり、肝臓での受容体によるこれらのリポタンパクの取り込みに際し、リガンドとして働く (Mahley RW. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. Science 1998;240:622-630.)。アポリipoprotein E 遺伝子の 158Cys ($\epsilon 2$) アリルはレムナントリポタンパクの肝臓の受
15 容体への結合異常を来し (Schneider WJ, Kovanen PT, Brown MS, et al. Familial dysbetalipoproteinemia. Abnormal binding of mutant apolipoprotein E to low density lipoprotein receptors of human fibroblasts and membranes from liver and adrenal of rats, rabbits, and cows. J Clin Invest 1981;6
20 8:1075-1085.)、血漿からの除去の遅延を生ずる (Gregg RE, Zech LA, Schaefer EJ, Brewer HB Jr. Type III hyperlipoproteinemia: defective metabolism of an abnormal apolipoprotein E. Science 1981;211:584-586.)。家族性 dysbeta lipoproteinemia (FD, または III 型高リポタンパク血症) 患者の多くは、Arg158 Cys 多型のホモ接合体である (Breslow JL, Zannis VI, SanGiacomo TR, Third J
25 L, Tracy T, Glueck CJ. Studies of familial type III hyperlipoproteinemia

using as a genetic marker the apo E phenotype E2/2. J Lipid Res 1982;23:1224-1235.)). しかし、158Cys/Cys ホモ接合体のうち わずか 1~4%しか家族性 dysbetalipoproteinemia を発症しないことから、他の遺伝因子あるいは環境因子が本疾患の発症に必要であると思われる。家族性 dysbetalipoproteinemia 患者における動脈硬化性レムナントリポタンパク (β -VLDL) の血漿中への蓄積 (Mahley RW. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. Science 1998;240:622-630.)あるいはヒト 158Cys/Cys を過剰発現したマウス (Sullivan PM, Mezdoor H, Quarfordt SH, Maeda N. Type II hyperlipoproteinemia and spontaneous atherosclerosis in mice resulting from gene replacement of mouse *ApoE* with human *APOE**2. J Clin Invest 1998;102:130-135.) は、動脈硬化の進展促進が認められる。Eto らは ϵ 2 (158Cys) アリルが日本人の男性(オッズ比 2.44, ϵ 2 allele 対 ϵ 3/ ϵ 3 型) および女性(オッズ比 3.03)で冠動脈疾患と関連することを報告した (Eto M, Watanabe K, Makino I. Increased frequency of apolipoprotein epsilon 2 and epsilon 4 alleles in patients with ischemic heart disease. Clin Genet 1989;36:183-188.)). 77 型 (158Cys/Cys) が心筋梗塞罹患の危険因子となるという本発明者らの結果は、Eto らの結果と一致する。

以上の実施例で検討した SNP のいくつかは、その近傍に存在する心筋梗塞発症と真に関連する遺伝子の SNP と連鎖不平衡にある可能性がある。しかしながら、男性で 9 個、女性で 5 個の遺伝子が日本人の心筋梗塞感受性遺伝子座であることが示された。さらに、組み合わせ遺伝子型により信頼性および予知確率の高いリスク診断が可能になった。このことから、本発明の診断方法は心筋梗塞の一次予防および中高年者の生活の質の改善ならびに医療費の削減に貢献できることが期待される。

この発明は、上記発明の実施の形態及び実施例の説明に何ら限定されるものではない。特許請求の範囲の記載を逸脱せず、当業者が容易に想到できる範囲で種々の変形態様もこの発明に含まれる。

5

以下、次の事項を開示する。

1 1. 以下の工程 (a1) を含んでなる、核酸試料の遺伝子型を検出する方法、

(a1) 核酸試料における、以下の (1) ~ (10) の多型を解析する工程、

(1) コネキシン 37 遺伝子の塩基番号 1019 位の多型、

10 (2) 腫瘍壊死因子 α 遺伝子の塩基番号 -863 位の多型、

(3) NADH/NADPH オキシダーゼ p22 フォックス遺伝子の塩基番号 242 位の多型、

(4) アンギオテンシノーゲン遺伝子の塩基番号 -6 位の多型、

(5) アポリポプロテイン E 遺伝子の塩基番号 -219 位の多型、

(6) 血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ遺伝子の塩基番号 994 位の多型、

15 (7) アポリポプロテイン C-III 遺伝子の塩基番号 -482 位の多型、

(8) トロンボスポンジン 4 遺伝子の塩基番号 1186 位の多型、

(9) インターロイキン 10 遺伝子の塩基番号 -819 位の多型、及び

(10) インターロイキン 10 遺伝子の塩基番号 -592 位の多型。

1 2. 以下の工程 (b1) を含んでなる、核酸試料の遺伝子型を検出する方法、

20 (b1) 核酸試料における、以下の (11) ~ (15) の多型を解析する工程、

(11) ストロメライン 1 遺伝子の塩基番号 -1171 位の多型、

(12) プラスミノゲン活性化因子インヒビター 1 遺伝子の塩基番号 -668 位の多型、

(13) グリコプロテイン Ib α 遺伝子の塩基番号 1018 位の多型、

25 (14) パラオキシナーゼ遺伝子の塩基番号 584 位の多型、及び

(15) アポリポプロテイン E 遺伝子の塩基番号 4070 位の多型。

1 3. 以下の工程 (I) ~ (III) を含んでなる、心筋梗塞のリスク診断方法、

(I) 核酸試料における、以下の (1) ~ (10) の多型を解析する工程、

(1) コネキシン 37 遺伝子の塩基番号 1019 位の多型、

5 (2) 腫瘍壊死因子 α 遺伝子の塩基番号-863 位の多型、

(3) NADH/NADPH オキシダーゼ p22 フォックス遺伝子の塩基番号 242 位の多型、

(4) アンギオテンシノーゲン遺伝子の塩基番号-6 位の多型、

(5) アポリポプロテイン E 遺伝子の塩基番号-219 位の多型、

(6) 血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ遺伝子の塩基番号 994 位の多型、

10 (7) アポリポプロテイン C-III 遺伝子の塩基番号-482 位の多型、

(8) トロンボスポンジン 4 遺伝子の塩基番号 1186 位の多型、

(9) インターロイキン 10 遺伝子の塩基番号-819 位の多型、及び

(10) インターロイキン 10 遺伝子の塩基番号-592 位の多型、

(II) 前記工程によって得られる多型情報から核酸試料の遺伝子型を決定する工

15 程、及び

(III) 決定された遺伝子型から心筋梗塞の遺伝的リスクを求める工程。

1 4. 以下の工程 (IV) ~ (VI) を含んでなる、心筋梗塞のリスク診断方法、

(IV) 核酸試料における、以下の (11) ~ (15) の多型を解析する工程、

(11) ストロメライン 1 遺伝子の塩基番号-1171 位の多型、

20 (12) プラスミノーゲン活性化因子インヒビター 1 遺伝子の塩基番号-668 位の多型、

(13) グリコプロテイン Ib α 遺伝子の塩基番号 1018 位の多型、

(14) パラオキシナーゼ遺伝子の塩基番号 584 位の多型、及び

(15) アポリポプロテイン E 遺伝子の塩基番号 4070 位の多型、

25 (V) 前記工程によって得られる多型情報から核酸試料の遺伝子型を決定する工

程、及び

(VI)決定された遺伝子型から心筋梗塞の遺伝的リスクを求める工程。

産業上の利用の可能性

- 5 本発明によれば心筋梗塞に関連する遺伝子多型が解析され、核酸試料の遺伝子型が検出される。この遺伝子型の検出によって得られる多型情報を用いることにより、高精度で予知確率の高い心筋梗塞のリスク診断を行うことができる。したがって、本発明は心筋梗塞の発症リスクを事前に知る有効な手段となる。また、本発明によればこれらの疾患の診断に有用な補助的情報が得られ、より適切な治療を可能とし予後の改善などを図ることができる。更に本発明は、心筋梗塞の発症メカニズムを解明する上での有効な情報を提供し、心筋梗塞の予防、治療へ貢献することが期待される。
- 10

請 求 の 範 囲

1. 以下の工程(a)を含んでなる、核酸試料の遺伝子型を検出する方法、

(a) 核酸試料における、以下の(1)～(10)からなるグループより選択される二

5 つ以上の多型を解析する工程、

(1) コネキシン 37 遺伝子の塩基番号 1019 位の多型、

(2) 腫瘍壊死因子 α 遺伝子の塩基番号-863 位の多型、

(3) NADH/NADPH オキシダーゼ p22 フォックス遺伝子の塩基番号 242 位の多型、

(4) アンギオテンシノーゲン遺伝子の塩基番号-6 位の多型、

10 (5) アポリポプロテイン E 遺伝子の塩基番号-219 位の多型、

(6) 血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ遺伝子の塩基番号 994 位の多型、

(7) アポリポプロテイン C-III 遺伝子の塩基番号-482 位の多型、

(8) トロンボスポンジン 4 遺伝子の塩基番号 1186 位の多型、

(9) インターロイキン 10 遺伝子の塩基番号-819 位の多型、及び

15 (10) インターロイキン 10 遺伝子の塩基番号-592 位の多型。

2. 以下の工程(b)を含んでなる、核酸試料の遺伝子型を検出する方法、

(b) 核酸試料における、以下の(11)～(15)からなるグループより選択される二

つ以上の多型を解析する工程、

20 (11) ストロメライン 1 遺伝子の塩基番号-1171 位の多型、

(12) プラスミノーゲン活性化因子インヒビター 1 遺伝子の塩基番号-668 位の
多型、

(13) グリコプロテイン Ib α 遺伝子の塩基番号 1018 位の多型、

(14) パラオキシナーゼ遺伝子の塩基番号 584 位の多型、及び

25 (15) アポリポプロテイン E 遺伝子の塩基番号 4070 位の多型。

3. 以下の工程(c)を含んでなる、核酸試料の遺伝子型を検出する方法、

(c) 核酸試料における、アポリポプロテイン E 遺伝子の塩基番号 4070 位の多型を解析する工程。

5

4. 以下の工程(i)～(iii)を含んでなる、心筋梗塞のリスク診断方法、

(i) 核酸試料における、以下の(1)～(10)からなるグループより選択される二つ以上の多型を解析する工程、

(1) コネキシン 37 遺伝子の塩基番号 1019 位の多型、

10

(2) 腫瘍壊死因子 α 遺伝子の塩基番号-863 位の多型、

(3) NADH/NADPH オキシダーゼ p22 フォックス遺伝子の塩基番号 242 位の多型、

(4) アンギオテンシノーゲン遺伝子の塩基番号-6 位の多型、

(5) アポリポプロテイン E 遺伝子の塩基番号-219 位の多型、

(6) 血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ遺伝子の塩基番号 994 位の多型、

15

(7) アポリポプロテイン C-III 遺伝子の塩基番号-482 位の多型、

(8) トロンボスポンジン 4 遺伝子の塩基番号 1186 位の多型、

(9) インターロイキン 10 遺伝子の塩基番号-819 位の多型、及び

(10) インターロイキン 10 遺伝子の塩基番号-592 位の多型、

(ii) 前記工程によって得られる多型情報から核酸試料の遺伝子型を決定する工

20

程、及び

(iii) 決定された遺伝子型から心筋梗塞の遺伝的リスクを求める工程。

5. 以下の工程(iv)～(vi)を含んでなる、心筋梗塞のリスク診断方法、

(iv) 核酸試料における、以下の(11)～(15)からなるグループより選択される二

25

つ以上の多型を解析する工程、

(11) ストロメライン 1 遺伝子の塩基番号-1171 位の多型、

(12) プラスミノージェン活性化因子インヒビター 1 遺伝子の塩基番号-668 位の多型、

(13) グリコプロテイン 1b α 遺伝子の塩基番号 1018 位の多型、

5 (14) パラオキシナーゼ遺伝子の塩基番号 584 位の多型、及び

(15) アポリポプロテイン E 遺伝子の塩基番号 4070 位の多型、

(v) 前記工程によって得られる多型情報から核酸試料の遺伝子型を決定する工程、及び

(vi) 決定された遺伝子型から心筋梗塞の遺伝的リスクを求める工程。

10

6. 以下の工程(vii)~(ix)を含んでなる、心筋梗塞のリスク診断方法、

(vii) 核酸試料における、アポリポプロテイン E 遺伝子の塩基番号 4070 位の多型を解析する工程、

(viii) 前記工程によって得られる多型情報から核酸試料の遺伝子型を決定する

15 工程、及び

(ix) 決定された遺伝子型から心筋梗塞の遺伝的リスクを求める工程。

7. 以下の(1)~(10)からなるグループより選択される二つ以上の核酸を含んでなる遺伝子型検出用キット、

20 (1) コネキシン 37 遺伝子の塩基番号 1019 位の多型を解析するための核酸、

(2) 腫瘍壊死因子 α 遺伝子の塩基番号-863 位の多型を解析するための核酸、

(3) NADH/NADPH オキシダーゼ p22 フォックス遺伝子の塩基番号 242 位の多型を解析するための核酸、

(4) アンギオテンシノーゲン遺伝子の塩基番号-6 位の多型を解析するための核

25 酸、

(5) アポリポプロテイン E 遺伝子の塩基番号-219 位の多型を解析するための核酸、

(6) 血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ遺伝子の塩基番号 994 位の多型を解析するための核酸、

5 (7) アポリポプロテイン C-III 遺伝子の塩基番号-482 位の多型を解析するための核酸、

(8) トロンボスポンジン 4 遺伝子の塩基番号 1186 位の多型を解析するための核酸、

10 (9) インターロイキン 10 遺伝子の塩基番号-819 位の多型を解析するための核酸、
及び

(10) インターロイキン 10 遺伝子の塩基番号-592 位の多型を解析するための核酸。

8. 以下の(11)～(15)からなるグループより選択される二つ以上の核酸を含んで
15 なる遺伝子型検出用キット、

(11) ストロメライン 1 遺伝子の塩基番号-1171 位の多型を解析するための核酸、

(12) プラスミノージェン活性化因子インヒビター1 遺伝子の塩基番号-668 位の多型を解析するための核酸、

20 (13) グリコプロテイン Ib α 遺伝子の塩基番号 1018 位の多型を解析するための核酸、

(14) パラオキシナーゼ遺伝子の塩基番号 584 位の多型を解析するための核酸、
及び

(15) アポリポプロテイン E 遺伝子の塩基番号 4070 位の多型を解析するための核酸。
25

9. アポリポロテインE 遺伝子の塩基番号 4070 位の多型を解析するための核酸、
を含んでなる遺伝子型検出用キット。

5 10. 以下の(1)～(10)からなるグループより選択される二つ以上の核酸が不溶性
支持体に固定されてなる固定化核酸、

(1) コネキシン 37 遺伝子の塩基番号 1019 位の多型を解析するための核酸、

(2) 腫瘍壊死因子 α 遺伝子の塩基番号-863 位の多型を解析するための核酸、

(3) NADH/NADPH オキシダーゼ p22 フォックス遺伝子の塩基番号 242 位の多型を

10 解析するための核酸、

(4) アンギオテンシノーゲン遺伝子の塩基番号-6 位の多型を解析するための核
酸、

(5) アポリポロテイン E 遺伝子の塩基番号-219 位の多型を解析するための核
酸、

15 (6) 血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ遺伝子の塩基番号 994 位の多型を
解析するための核酸、

(7) アポリポロテイン C-III 遺伝子の塩基番号-482 位の多型を解析するた
めの核酸、

(8) トロンボスポンジン 4 遺伝子の塩基番号 1186 位の多型を解析するた
20 めの核酸、

(9) インターロイキン 10 遺伝子の塩基番号-819 位の多型を解析するた
め及び

(10) インターロイキン 10 遺伝子の塩基番号-592 位の多型を解析するた
めの核
酸。

1 1. 以下の(11)～(15)からなるグループより選択される二つ以上の核酸が不溶性支持体に固定されてなる固定化核酸、

(11)ストロメライン 1 遺伝子の塩基番号-1171 位の多型を解析するための核酸、

5 (12)プラスミノゲン活性化因子インヒビター1 遺伝子の塩基番号-668 位の多型を解析するための核酸、

(13)グリコプロテイン 1b α 遺伝子の塩基番号 1018 位の多型を解析するための核酸、

(14)パラオキシナーゼ遺伝子の塩基番号 584 位の多型を解析するための核酸、

10 及び

(15)アポリポプロテインE 遺伝子の塩基番号 4070 位の多型を解析するための核酸。

1 2. アポリポプロテインE 遺伝子の塩基番号 4070 位の多型を解析するための核酸が不溶性支持体に固定されてなる固定化核酸。

15

Fig.1

遺伝子	多型	遺伝子	多型
アンギオテンシン変換酵素	I/D in intron 16	インスリン受容体サブストレート 1	3494G→A (Gly972Arg)
アンギオテンシン II タイプ I 受容体	-535C→T	インターロイキン-10	-1082G→A
アンギオテンシンノーゲン	-6G→A		-819T→C
アポリポプロテイン A1	-75G→A		-592A→C
	83C→T	インターロイキン-1α	-889C→T
アポリポプロテイン B	I/D in signal peptide	インターロイキン-1β	-511C→T
アポリポプロテイン C-III	-482C→T		3953C→T
	1100C→T	インターロイキン-6	-634C→G
アポリポプロテイン E	-491A→T		-174G→C
	-219G→T	LDL 受容体関連タンパク質	766C→T
	3932T→C (Cys112Arg)	レプチン	-1887C→A
	4070C→T (Arg158Cys)	リポプロテインリパーゼ	280G→A (Asp9Asn)
アポリポプロテイン(a)	93C→T	マンガンスーパーオキシドジスムターゼ	1127A→G (Asn291Ser)
	121G→A		47C→T (Ala16Val)
ATP-結合カセットトランスポーター1	11764A→C (Thr12Pro)	マトリックス Gla タンパク質	173T→C (Ile58Thr)
	-477C→T		-7G→A
心臓性ナトリウム利尿ペプチド (ANP)	1051G→A (Arg219Lys)	メタロプロテナーゼ-1 (コラゲナーゼ)	7158A→G (Thr83Ala)
ANP クリアランス受容体	664G→A (Val7Met)	メタロプロテナーゼ-12	-1607G→GG
	-55A→C	(マクロファージ エラスターゼ)	-82A→G
β2-アドレナリン受容体	46A→G (Arg16Gly)	メチオニンシタナーゼ	2756A→G (Asp919Gly)
	79C→G (Gln27Glu)	メチレンテトラヒドロ葉酸リダクターゼ	677C→T (Ala222Val)
β3-アドレナリン受容体	491C→T (Thr164Ile)	単球ケモカイン誘引タンパク (MCP) 1	-2518G→A
β-フィブリノーゲン	190T→C (Trp64Arg)	NADH/NADPH オキシダーゼ p22 フォックス	242C→T (His72Tyr)
	-854G→A	ニューロペプチド Y	1128T→C (Leu7Pro)
	-455G→A	バラオキソナーゼ	-107T→C
	148C→T		172A→T (Met55Leu)
	8059G→A (Arg448Lys)		584G→A (Gln192Arg)
CD14 受容体	-260C→T	PECAM1 (CD31)	1454C→G (Leu125Val)

Fig.2

ケモカイン受容体 2	190G→A (Val64Ile)	PECAM1 (CD31)	4428G→A (Ser563Asn)
コレステロールエステル輸送タンパク	1061A→G (Ile405Val)	ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体-α	696C→G (Leu162Val)
	1163A→G (Asp442Gly)	ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体-γ2	34C→G (Pro12Ala)
凝固因子 V	1200G→A (Arg451Gln)		344C→A (Pro115Gln)
凝固因子 VII	1691G→A (Arg506Gln)	プラスミノーゲン活性化因子インヒビター-1-668/4G→5G	
凝固因子 XII	11496G→A (Arg353Glu)	血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ	994G→T (Val279Phe)
凝固因子 XIII A-サブユニット	46C→T	プロトロンビン	20210G→A
コネキシン 37	163G→T (Val34Leu)	P-セレクチン	7666A→C (Thr715Pro)
一酸化窒素合成酵素	1019C→T (Pro319Ser)	スカベンジャー受容体-BI	4G→A (Gly2Ser)
	-786T→C		403G→A (Val135Ile)
エンドセリン-1	894G→T (Glu298Asp)	セロトニン 2A 受容体 r	102T→C
E-セレクチン	5665G→T (Lys198Asn)	ストロメライシン-1	-1171/5A→6A
	98G→T	トロンプモジュリン	-33G→A
	561A→C (Ser128Arg)		-10GG→TA
細胞外スーパロキシドジスムターゼ	1839C→T (Leu554Phe)		845G→A (Ala25Thr)
脂肪酸結合タンパク 2	5775C→G (Arg213Gly)		2136C→T (Ala455Val)
フラクタルカイン受容体	2445G→A (Ala54Thr)	トロンプボイエチン	5713A→G
グリコプロテイン Ia	84635G→A (Val249Ile)	トロンプスボンジン 1	2210A→G (Asn700Ser)
	807C→T	トロンプスボンジン 4	1186G→C (Ala387Pro)
	873G→A	外因系凝固 (組織因子) インヒビター	874G→A (Val264Met)
	1648A→G (Lys505Glu)	トランスフォーミング増殖因子-β1	-509C→T
グリコプロテイン Ibα	1018C→T (Thr145Met)	腫瘍壊死因子-α	869T→C (Leu10Pro)
グリコプロテイン IIIa	1565T→C (Leu33Pro)		-863C→A
グリコプロテイン PC-1	97A→C (Lys121Gln)		-850C→T
G-タンパク質 β3 サブユニット	825C→T (splice variant)		-308G→A
ヘモクロマトーシス関連タンパク質	845G→A (Cys282Tyr)	フォンビルブラント因子	-238G→A
肝性リパーゼ	-480C→T		-1234C→T
	-250G→A		-1051G→A

Fig.3

遺伝子	一塩基多型	標識	プライマー	回数	プローブ	ホルミド
アニリング温度 55-67.5°C; Mg, 1-4 mM						
血小板活性化因子 アセチルヒドロラーゼ	994G→T	FITC	TTCTTTTGGTGGAGCAACNGT	40		
		TxR	ATTCTTTTGGTGGAGCAACNTT			
NADH/NADPH オシダーゼ p22 フォックス	242C→T	biotin	TCCTTACCTGAATCTCTGATCTTCA	40		
		FITC	ACCACGGCGGTCATGNGC			
コネキシン 37	1019C→T	TxR	ACCACGGCGGTCATGNAC	35		
		biotin	GCAGCAAAAGGAGTCCCGAGT			
アンギオテンシンノーゲン	-6G→A	TxR	CTCAGAATGGCCAAAANCC	35		
		FITC	CCTCAGAATGGCCAAAANTC			
腫瘍壊死因子-α	-863C→A	biotin	GCAGAGCTGCTGGGACGA	35		
		TxR	CGGCAGCTTCTTCCNCG			
アポリポプロテイン C-III	-482C→T	FITC	CGGCAGCTTCTTCCNIG	35		
		biotin	CCACCCCTCAGCTATAAATAGG			
インターロイキン-10	-592A→C	TxR	GGCCCTGTCTTCGTTAANGG	35		
		FITC	ATGGCCCTGTCTTCGTTAANTG			
		biotin	CCAGGGCTATGGAAGTCGAGTATC	35	AGCCACTGATGCNCGGTCT	30%
		biotin	CGGAGCCACTGATGCNCG		AGCCACTGATGCNTGGTCT	
		biotin	CGGAGCCACTGATGCNIG	35		
		biotin	TGTTTGGAGTAAAGGCACAGAA			
		FITC	CAGAGACTGGCTTCTACANGA	35		
		TxR	CCAGAGACTGGCTTCTACANTJA			
		biotin	GCCTGGAACACATCCTGTGA			

Fig.4

アポリポrotein E	-219G→T	FITC	GAATGGAGGAGGGTGTCTNGA	35	
		TxR	AGAAATGGAGGAGGGTGTCTNTA		
		biotin	CCAGGAAGGAGGACACCTC		
インターロイキン-10	-819T→C		TACCCCTTGACAGGTGATGANTA		40%
			TACCCCTTGACAGGTGATGANTCA	35	GTACAGGTGATGANTATCTCTGTG
		biotin	ATAGTGAGCAAACTGAGGCACA		GTACAGGTGATGANTATCTCTGTG
トロンスポンジン 4	1186G→C	TxR	CGAGTTGGGAACGCACNCT		
		FITC	CGAGTTGGGAACGCACNCT	35	
		biotin	GGTCTGCACTGACATTGATGAG		
パラオキソナーゼ	584G→A	FITC	ACCCAAATACATCTCCAGGANG		
		TxR	AACCCAAATACATCTCCAGGANG	35	
		biotin	GAATGATATTTGTTGCTGTGGGAC		
アポリポrotein E	4070C→T	FITC	CCGATGACCTGCAGAAACG		
		TxR	GCCGATGACCTGCAGAAATG	40	
		biotin	CGGCTGTGTACACTGCCAG		
プラスミノーゲン	-668/4G→5G		GGCACAGAGAGAGTCTGGACACG		
活性化因子インヒビター-1		biotin	GGCCGCCCTCCGATGATACA		
ストロメライン-1	-1171/5A→6A	FITC	TTTGATGGGGGGAANAAC	35	45%
		TxR	TTTGATGGGGGGAANAAC	40	TGGACACGTGGGGGAGTCAG
		biotin	CCTCATATCAATGTGGCCAA		TGGACACGTGGGGGAGTCAGC
グリコprotein Iba	1018C→T	FITC	CCCAGGGCTCCTGNCG		
		TxR	CCCAGGGCTCCTGNTG	40	
		biotin	TGAGCTTCTCCAGCTTGGGTG		

Fig.5

	男性 (n = 451)		女性 (n = 458)	
	対照 (n = 232)	心筋梗塞症例 (n = 219)	対照 (n = 232)	心筋梗塞症例 (n = 226)
年齢 (years)	52.4 ± 3.6	51.8 ± 6.0	62.6 ± 8.8	62.2 ± 8.3
Body mass index (kg/m ²)	23.8 ± 2.5	24.2 ± 2.7	23.4 ± 3.2	23.2 ± 2.9
喫煙 (%)	60.3	60.7	9.5	16.5*1
高血圧 (%)	43.5	42.9	69.8	65.5
糖尿病 (%)	11.2	16.0	15.5	36.7*2
高コレステロール血症 (%)	45.3	52.5	59.9	66.8
高尿酸血症 (%)	16.4	21.0	10.3	11.9

Fig. 6

遺伝子	多型	遺伝子 モデル	P	多型	遺伝子 モデル	P
男性						
血小板活性化因子αセチルヒドロラーゼ	994G→T	付加	0.0006	パラオキソナーゼ	584G→A	0.009
NADH/NADPHオシダーゼp22フォックス	242C→T	優性	0.006	インターロイキン-6	-634C→G	0.009
コネキシン 37	1019C→T	付加	0.007	コネキシン37	1019C→T	0.013
トロンスボンジン 4	1186G→C	優性	0.013	ATP-結合カセツトトランスポーター-1	1051G→A	0.014
アンギオテンシンノーゲン	-6G→A	劣性	0.019	腫瘍壊死因子-α	-850C→T	0.015
腫瘍壊死因子-α	-863C→A	優性	0.045	エンドセリン-1	5665G→T	0.028
トランスフォーミング増殖因子-β1	869T→C	付加	0.049	アポリポプロテインE	4070C→T	0.038
G-タンパク質 β3サブユニット	825C→T	付加	0.051	アポリポプロテインC-III	-482C→T	0.044
アポリポプロテインC-III	-482C→T	劣性	0.057	アポリポプロテインE	3932T→C	0.047
インターロイキン-10	-819T→C	劣性	0.061	CD14受容体	-260C→T	0.050
トロンスボンジン	2136C→T	付加	0.065	腫瘍壊死因子-α	-238G→A	0.052
アンギオテンシンノーゲン	4070C→T	付加	0.074	プラスミノーゲン活性化因子	-668/4G→5G	0.055
グリコプロテインIa	A1648→G	劣性	0.080	インヒビター-1		
インターロイキン-10	-592A→C	劣性	0.088	脂肪酸結合タンパク質2	2445G→A	0.057
アポリポプロテインE	-219G→T	劣性	0.092	インスリン受容体サブストレート-1	3494G→A	0.058
トロンスボンジン	5713A→G	劣性	0.094	ストロメライシン-1	-1171/5A→6A	0.072
アポリポプロテインC-III	1100C→T	劣性	0.095	グリコプロテインIbα	1018C→T	0.072
ケモカイン受容体2	190G→A	劣性	0.097	E-セクレチン	A561→C	0.074
一酸化窒素合成酵素	-786T→C	優性	0.098	一酸化窒素合成酵素	-786T→C	0.087

Fig. 7

	男性 (n = 3309)		女性 (n = 1752)	
	対照 (n = 1306)	心筋梗塞症例 (n = 2003)	対照 (n = 936)	心筋梗塞症例 (n = 816)
年齢(years)	60.1 ± 9.6	60.8 ± 10.3	60.8 ± 11.2	60.5 ± 10.6
Body mass index (kg/m ²)	23.6 ± 2.6	23.6 ± 2.9	23.0 ± 3.3	23.4 ± 3.5*1
喫煙 (%)	57.6	58.2	9.5	15.5*2
高血圧 (%)	53.6	45.0*2	59.4	55.9
糖尿病 (%)	15.4	32.4*2	16.5	42.1*1
高コレステロール血症 (%)	35.4	43.7*2	51.2	56.8*3
高尿酸血症 (%)	17.2	14.2*3	9.7	13.2*1

Fig. 8

遺伝子		遺伝子型分布 (%)					
多型		対照		心筋梗塞症例			
男性 (n = 3309)							
コネキシン37	1019C→T	CC, 72.5	CT, 22.7	TT, 4.9	CC, 66.3	CT, 28.8	TT, 4.9
腫瘍壊死因子- α	-863C→A	CC, 70.9	CA, 20.7	AA, 8.5	CC, 75.5	CA, 17.9	AA, 6.6
NADH/NADPHオシダーゼp22フォックス	242C→T	CC, 74.8	CT, 24.2	TT, 1.0	CC, 79.7	CT, 19.0	TT, 1.3
アンギオテンシンノーゲン	-6G→A	GG, 2.6	GA, 29.6	AA, 67.8	GG, 4.3	GA, 33.4	AA, 62.3
アポリipoproteinE	-219G→T	GG, 8.4	GT, 42.7	TT, 48.9	GG, 7.2	GT, 39.2	TT, 53.6
血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ	994G→T	GG, 71.2	GT, 26.3	TT, 2.5	GG, 68.1	GT, 29.2	TT, 2.6
アポリipoproteinC-III	-482C→T	CC, 28.1	CT, 48.4	TT, 23.5	CC, 27.5	CT, 51.2	TT, 21.3
トロンスポンジン4	1186G→C	GG, 88.1	GC, 11.8	CC, 0.1	GG, 85.4	GC, 14.0	CC, 0.5
インターロイキン-10	-819T→C	TT, 47.2	TC, 42.4	CC, 10.4	TT, 47.2	TC, 39.6	CC, 13.1
インターロイキン-10	-592A→C	AA, 47.5	AC, 41.8	CC, 10.6	AA, 46.2	AC, 40.4	CC, 13.4
女性 (n = 1752)							
ストロメライン-1	-1171/5A→6A	5A/5A, 1.2	5A/6A, 47.1	6A/6A, 51.7	5A/5A, 1.8	5A/6A, 37.9	6A/6A, 60.2
プラスミノーゲン活性化因子インヒビター-1	-668/4G→5G	4G/4G, 43.8	4G/5G, 44.2	5G/5G, 12.0	4G/4G, 37.3	4G/5G, 49.6	5G/5G, 13.1
グリコipoproteinIba	1018C→T	CC, 76.7	CT, 20.8	TT, 2.5	CC, 77.7	CT, 21.6	TT, 0.7
パラオキシナーゼ	584G→A	GG, 44.7	GA, 45.0	AA, 10.3	GG, 44.6	GA, 41.7	AA, 13.6
アポリipoproteinE	4070C→T	CC, 91.2	CT, 8.7	TT, 0.1	CC, 91.8	CT, 7.2	TT, 1.0

Fig. 9

遺伝子	多型	優性		劣性		付加	
		P	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)		
男性 (n = 3309)							
コネキシン37	1019C→T	0.0001	1.4 (1.2-1.7)	0.7834		<0.0001	1.5 (1.2-1.7)
腫瘍壊死因子-α	-863C→A	0.0020	0.7 (0.6-0.9)	0.0235	0.7 (0.5-1.0)	0.0105	0.7 (0.5-0.9)
NADH/NADPHオキシダーゼp22フォックス	242C→T	0.0027	0.7 (0.6-0.9)	0.9462		0.0021	0.7 (0.6-0.9)
アンギオテンシンノーゲン	-6G→A	0.0563		0.0038	0.8 (0.7-0.9)	0.0283	0.6 (0.4-0.9)
アポリipoprotein E	-219G→T	0.4015		0.0085	1.2 (1.1-1.4)	0.1557	
血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ	994G→T	0.0349	1.2 (1.0-1.4)	0.6522		0.0227	1.2 (1.0-1.4)
アポリipoprotein C-III	-482C→T	0.6297		0.0367	0.8 (0.7-1.0)	0.2716	
トロンプスポンジン4	1186G→C	0.0373	1.3 (1.0-1.6)	0.0834		0.0700	
インターロイキン-10	-819T→C	0.9108		0.0375	1.3 (1.0-1.6)	0.0738	
インターロイキン-10	-592A→C	0.2692		0.0427	1.3 (1.0-1.6)	0.0394	1.3 (1.0-1.7)
女性 (n = 1752)							
ストロメライシン-1	-1171/5A→6A	<0.0001	2.1 (1.6-2.8)	0.0002	1.5 (1.2-1.9)	<0.0001	2.2 (1.6-2.9)
プラスミノーゲン活性化因子インヒビター-1	-668/4G→5G	0.0008	1.5 (1.2-1.8)	0.4495		0.0010	1.5 (1.2-1.9)
グリコipoprotein Ibaα	1018C→T	0.6065		0.0238	0.3 (0.1-0.8)	0.0242	0.3 (0.1-0.8)
パラオキシナーゼ	584G→A	0.3966		0.0349	1.4 (1.0-2.0)	0.1017	
アポリipoprotein E	4070C→T	0.6881		0.0399	9.7 (1.6-185.6)	0.0418	9.5 (1.6-181.7)

Fig. 1 0

遺伝子	遺伝子座	多型	遺伝モデル	P	オッズ比	95% CI
男性						
コネキシン37	1p35.1	1019C→T	TT + CT versus CC	0.0124	1.31	1.06-1.61
腫瘍壊死因子-α	6p21.3	-863C→A	AA + CA versus CC	0.0336	0.79	0.64-0.98
NADH/NADPHオキシダーゼp22プロモーター	16q24	242C→T	TT + CT versus CC	0.2926	0.88	0.70-1.11
アンギオテンシンノーゲン	1q42-q43	-6G→A	AA versus GA + GG	0.0251	0.79	0.65-0.97
アポリポプロテインE	19q13.2	-219G→T	TT versus GT + GG	0.0209	1.26	1.03-1.51
血小板活性化因子αセチルヒドロラーゼ	6p21.2-p12	994G→T	TT + GT versus GG	0.0155	1.30	1.05-1.59
アポリポプロテインC-III	11q23	-482C→T	TT versus CT + CC	0.0606	0.80	0.64-1.01
トロンプスポンジン4	5q13	1186G→C	CC + GC versus GG	0.0011	1.64	1.22-2.21
インターロイキン-10	1q31-q32	-819T→C	CC versus CT + TT	0.5643	1.20	0.65-2.17
インターロイキン-10	1q31-q32	-592A→C	CC versus CA + AA	0.6323	1.16	0.63-2.12
女性						
ストロメラシン-1	11q23	-1171/5A→6A	6A/6A + 5A/6A versus 5A/5A	<0.0001	1.87	1.42-2.47
プラスミノーゲン活性化因子インヒビター-1	7q21.3-q22	-668/4G→5G	5G/5G + 4G/5G versus 4G/4G	0.0005	1.50	1.19-1.89
グリコプロテインIbα	22q11.2	1018C→T	TT versus CT + CC	0.0308	0.28	0.09-0.89
パラオキシナーゼ	7q21.3	584G→A	AA versus GA + GG	0.1889	1.27	0.89-1.81
アポリポプロテインE	19q13.2	4070C→T	TT versus CT + CC	0.0872	6.96	0.75-64.36

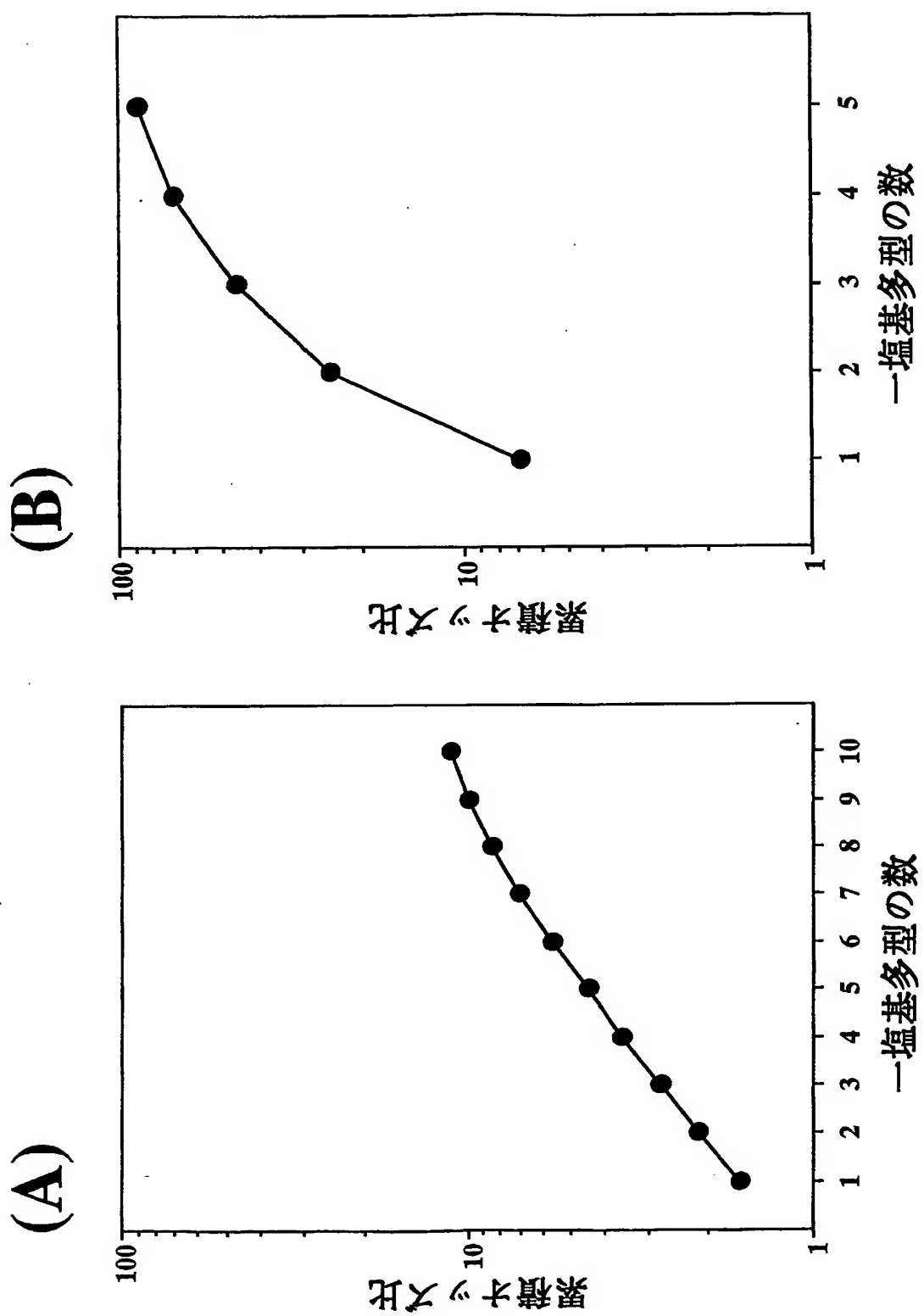
Fig. 1 1

トロンボスポンジン 4 (0 = GG, 1 = GC = CC)	コネキシシン 37 (0 = CC, 1 = CT = TT)	PAFアセチルヒドロラーゼ (0 = GG, 1 = GT = TT)	アンギオテンシノーゲン (0 = GA = GG, 1 = AA)	腫瘍壊死因子-α (0 = CC, 1 = CA = AA)	オッズ 比
1	1	1	0	0	4.50
1	1	1	0	1	3.55
1	1	1	1	0	3.55
1	1	1	1	1	2.79
1	1	0	0	0	3.47
1	1	0	0	1	2.73
1	1	0	1	0	2.73
1	1	0	1	1	2.15
1	0	1	0	0	3.44
1	0	1	0	1	2.71
1	0	1	1	0	2.71
1	0	1	1	1	2.13
1	0	0	0	0	2.65
1	0	0	0	1	2.08
1	0	0	1	0	2.08
1	0	0	1	1	1.64
0	1	1	0	0	2.75
0	1	1	0	1	2.16
0	1	1	1	0	2.16
0	1	0	0	0	1.70
0	1	0	0	1	2.11
0	1	0	0	0	1.66
0	1	0	1	0	1.66
0	1	0	1	1	1.31
0	0	1	0	0	2.10
0	0	1	0	1	1.65
0	0	1	1	0	1.65
0	0	1	1	1	1.30
0	0	0	0	0	1.61
0	0	0	0	1	1.27
0	0	0	1	0	1.27
0	0	0	1	1	1.00

Fig. 1 2

アポリプロテインE (0 = CC = CT, 1 = TT)	グリコプロテインIba (0 = CC = CT, 1 = TT)	ストロメライシン-1 (0 = 5A/5A, 1 = 5A/6A = 6A/6A)	アラミノ-ダ'活性化因子インビタ-1 (0 = 4G/4G, 1 = 4G/5G = 5G/5G)	パラオキシナーゼ (0 = GG = GA, 1 = AA)	オッズ 比
1	0	1	1	1	88.51
1	0	1	1	0	69.70
1	0	1	0	1	59.01
1	0	1	0	0	46.46
1	0	0	1	1	47.33
1	0	0	1	0	37.27
1	0	0	0	1	31.56
1	0	0	0	0	24.85
1	1	1	1	1	24.79
1	1	1	1	0	19.52
1	1	1	0	1	16.53
1	1	1	0	0	13.02
1	1	0	1	1	13.26
1	1	0	1	0	10.44
1	1	0	0	1	8.84
1	1	0	0	0	6.96
0	0	1	1	1	12.72
0	0	1	1	0	10.01
0	0	1	0	1	8.48
0	0	1	0	0	6.68
0	0	0	1	1	6.80
0	0	0	1	0	5.36
0	0	0	0	1	4.53
0	0	0	0	0	3.57
0	1	1	1	1	3.56
0	1	1	1	0	2.81
0	1	1	0	1	2.37
0	1	1	0	0	1.87
0	1	0	1	1	1.91
0	1	0	1	0	1.50
0	1	0	0	1	1.27
0	1	0	0	0	1.00

Fig. 1 3



SEQUENCE LISTING

<110> NAGOYA INDUSTRIAL SCIENCE RESEARCH INSTITUTE
GIFU INTERNATIONAL INSTITUTE OF BIOTECHNOLOGY
YAMADA, Yoshiji
YOKOTA, Mitsuhiro

<120> Method for diagnosing myocardial infarction risk

<130> C0200201

<150> JP P2002-181580

<151> 2002-06-21

<160> 64

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1601

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

ctccggccat cgtccccacc tccacctggg ccgcccgcga ggcagcggac ggaggccggg	60
agccatgggt gactggggct tcctggagaa gttgctggac caggtccagg agcactcgac	120
cgtggtgggt aagatctggc tgacggtgct ctcatcttc cgcacctca tcttgggcct	180
ggccggcgag tcagtgtggg gtgacgagca gtcagatttc gagtgtaaca cggcccagcc	240
aggctgcacc aacgtctgct atgaccaggc ctccccatc tccacatcc gctactgggt	300
gctgcagttc ctcttctca gcacaccac cctgggtctac ctgggcatg tcatttacct	360
gtctcggcga gaagagcggc tgcggcagaa ggagggggag ctgcgggcac tgccggccaa	420
ggaccacag gtggagcggg cgctggcggc cgtagagcgt cagatggcca agatctcggt	480
ggcagaagat ggtcgcttgc gcatccgcgg agcactgatg ggcacctatg tcgccagtgt	540
gctctgcaag agtgtgctag aggcaggctt cctctatggc cagtggcgcc tgtacggctg	600

gaccatggag cccgtgtttg tgtgccagcg agcaccctgc ccctacctcg tggactgctt 660
tgtctctcgc cccacggaga agaccatctt catcatcttc atgttgggtg ttggactcat 720
ctccctgggtg cttaacctgc tggagtgggt gcacctgctg tgtcgctgcc tcagccgggg 780
gatgagggca cggcaaggcc aagacgcacc cccgaccagc ggcacctcct cagaccctta 840
cacggaccag gtcttcttct acctccccgt gggccagggg ccctcatccc caccatgccc 900
cacctacaat gggctctcat ccagttagca gaactgggcc aacctgacca cagaggagag 960
gctggcgctt tccaggcccc ctctcttctt ggaccacccc cctcagaatg gccaaaaacc 1020
cccaagtcgt cccagcagct ctgcttctaa gaagcagtat gtatagaggc ctgtggctta 1080
tgtcaccaa cagaggggtc ctgagaagtc tggctgcctg ggatgcccc tgccccctcc 1140
tggaaggctc tcagagatg actgggctgg ggaagcagat gcttgctggc catggagcct 1200
cattgcaagt tgttcttgaa cacctgaggc ctctctgttg cccaccaggc actacggctt 1260
cctctccaga tgtgctttgc ctgagcacag acagtcagca tggaatgctc ttggccaagg 1320
gtactggggc cctctggcct ttgacagctg atccagagga acccagagcc aacttacccc 1380
aacctacccc tatggaacag tcacctgtgc gcaggtgtc ctcaaaccct ctcttcacag 1440
gaaaaggcgg attgaggctg ctgggtcagc ctgatcgca cagacagagc ttgtgccgga 1500
tttggccctg tcaaggggac tggctgcctt tttcatcac tccttcctag ttctactgtt 1560
caagcttctg aaataaacag gacttgatca caaaaaaaaa a 1601

<210> 2

<211> 1178

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (881)..(881)

<223> n stands for any base

<400> 2

ggggaagcaa aggagaagct gagaagaatga aggaaaagtc agggctctgga ggggcggggg	60
tcaggagact cctgggagat atggccacat gtagcggctc tgaggaatgg gttacaggag	120
acctctgggg agatgtgacc acagcaatgg gtaggagaat gtccaggcgt atggaagtcg	180
agtatcgggg accccccctt aacgaagaca gggccatgta gagggcccca gggagtgaaa	240
gagcctccag gacctccagg tatggaatac aggggacggt taagaagata tggccacaca	300
ctggggccct gagaagttag agcttcatga aaaaaatcag ggaccccaga gttccttgga	360
agccaagact gaaaccagca ttatgagtct ccgggtcaga atgaaagaag aaggcctgcc	420
ccagtggctt gtgaattccc gggggtgatt tcactccccg ggctgtccca ggcttgtccc	480
tgctaccccc acccagcctt tctgaggcc tcaagctgcc accaagcccc cagctccttc	540
tccccgcaga cccaaacaca ggcctcagga ctcaacacag cttttccctc caaccccgtt	600
ttctctcct caaggactca gctttctgaa gcccctcca gttctagttc tatcttttc	660
ctgcatactg tctggaagtt agaaggaaac agaccacaga cctgggtcccc aaaagaaatg	720
gaggcaatag gttttgagg gcatggggac ggggttcagc ctccagggtc ctacacacaa	780
atcagtcagt ggcccagaag acccccctcg gaatcggagc agggaggatg gggagtgtga	840
gggtatcct tgatgcttgt gtgtcccaa ctttccaaat nccgcccc gcgatggaga	900
agaaaccgag acagaagggt caggggccac taccgttcc tccagatgag cttatgggtt	960
tctccaccaa ggaagtttc cgctggttga atgattctt cccgcccctc ctctcgcccc	1020
aggacatat aaaggcagtt gttggcacac ccagccagca gacgtccct cagcaaggac	1080
agcagaggac cagctaagag ggagagaagc aactgcagac cccccctgaa aacaaccctc	1140
agacgccaca tcccctgaca agctgccagg caggttct	1178

<210> 3
<211> 971
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 3
ccaggctgca gtgcagtggg gcagctgtga ctcatggcag cctccacctg gctcaggcca 60
ccctcttacc tcagcctctg gagtagctgg gaccacaggc acacaccact gcacctggct 120
tttaaatttt ttgtagagat gagggctctca ctatgttgcc caggctgggc tcaaactcct 180
gggctccagt gatcctcccg cctcagccctc ccaaaatgct gggattccag gcatgagcca 240
ccgtgctcgg gccctctctt gtgttgtctt cagtaaaggg agttccctgt ggcccctcag 300
gctgagctgg gctgttcctt aaccacatgg cttcagtgtg gcgggcgtgt ttgtgtgcct 360
gctggagtag ccccggggga agaggaagaa gggctccacc atggagcgct ggtgagtctc 420
ctcctgatct ggggtctctc cgggggctgc gggggccagg cagggtcac agggttgggt 480
ggagcttggg ttctcacttg gaggtccgg aaccaaccct ttggtgcttg tgggtaaacc 540
aaggccggtg cctgcccggt gtgtttgtg ggaggaaaga ggcctgggtg ccctggggtg 600
gtcagcaggg cagcaaagga gtcccagtg ggagaggccc agccgcgcg tctcgcttc 660
ctccctcccc caggggacag aagtacatga ccgccgtggg gaagctgttc gggcccttta 720
ccaggaatta ctatgttcgg gccgtcctgc atctcctgtg agtccccgtc ccgcaccccc 780
tctagggtc aggagggtt ggagccgacc ctccccactg tcccaccggc cgggctgcct 840
ggacaggagc cccccccact tacctcagtg tttttccaaa caaaaattcg ggtccctggc 900
tctggcaggg cctgtgtctg ctgtctagtg tgcaggattt gtaaggatcc actccaatc 960
cgaggagctc g 971

<210> 4
<211> 1278
<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

ccagacaagt gatttttgag gaggccctat ctataggaac aaagtaatta aaaaaatgta	60
tttcagaatt tacaggccca tggagatat gatttttta aatgaagatt tagagtaatg	120
ggtaaaaaag aggtatttgt gtgtttgttg attgttcagt cagtgaatgt acagcttctg	180
cctcatatcc aggcaccatc tcttcctgct cttgtttgtt aaatgttcca ttctgggta	240
atttcatgtc tgccatcgtg gatatgccgt ggctccttga acctgcttgt gttgaagcag	300
gatcttccct cctgtccctt cagtgccta ataccatgta tttaggctg gacacatcac	360
cactcccaac ctgctcacc cactgcgtca cttgtgatca ctggcttctg gcgactctca	420
ccaaggtctc tgtcatgccc tgttataacg actacaaaag caagtcttac ctataggaaa	480
ataagaatta taaccctttt actggcatg tgaaacttac catttgcaat ttgtacagca	540
taaacacaga acagcacatc tttcaatgcc tgcacctga aggcattttg tttgtgtctt	600
tcaatctggc tgtgtattg ttggtgttta acagtctccc cagctacact ggaaacttcc	660
agaaggcact tttcacttgc ttgtgtgttt tcccagtg ctattagagg ctttgcaca	720
gggtaggctc ttggagcag ctgaaggta cacatccat gagcgggcag cagggtcaga	780
agtggcccc gtgttgcta agcaagactc tcccctgcc tctgccctct gcacctcgg	840
cctgatgtc cctgtggcct cttggggta catctccgg ggctgggtca gaaggcctgg	900
gtggttggcc tcaggctgtc acacacctag ggagatgtc ccgtttctgg gaaccttggc	960
cccgactcct gcaaacttgc gtaaatgtgt aactcgacc tgcaccggct cactctgttc	1020
agcagtgaac ctctgcatg atcactaaga ctctctggaa gaggtcccag cgtgagtgtc	1080
gcttctggca tctgtccttc tggccagcct gtggtctggc caagtgatgt aaccttctc	1140
tccagcctgt gcacaggcag cctgggaaca gctccatccc caccctcag ctataaatag	1200
ggcctcgtga cccggccagg ggaagaagct gccgttgttc tgggtactac agcagaaggt	1260

aagccggggg cccctca

1278

<210> 5

<211> 1426

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

caaggtcaca cagctggcaa ctggcagagc caggattcac gccctggcaa ttgactcca	60
gaatcctaac cttaaccag aagcacggct tcaagcccct ggaaaccaca atacctgtgg	120
cagccagggg gaggtgctgg aatctcattt cacatgtggg gagggggctc cctgtgctc	180
aaggtcaca ccaagagga agctgtgatt aaaaccagg tccatttgc aaagcctga	240
cttttagcag gtgcatcata ctgttccac ccctcccatc ccacttctgt ccagccgcct	300
agccccactt tctttttttt ctttttttga gacagtctcc ctcttgctga ggctggagt	360
cagtggcgag atctcggtc actgtaacct cgcctcccg ggttcaagcg attctcctgc	420
ctcagcctcc caagtagcta ggattacagg cggccggcac cacgcctggc taactttgt	480
atttttagta gagatgggtt ttaccatgt tggccaggct ggtctcaaac tctgacctt	540
aagtgattcg cccactgtgg cctcccaaag tgctgggatt acaggcgtga gctaccgcc	600
ccagcccctc ccatccact tctgtccagc cccctagccc tactttcttt ctgggatcca	660
ggagtccaga tcccagccc cctctccaga ttacattcat ccaggcacag gaaaggacag	720
ggtcaggaaa ggaggactct gggcggcagc ctccacattc ccctccacg ctggccccc	780
agaatggagg aggggtgtctg tattactggg cgaggtgtcc tcccttctg gggactgtg	840
gggttggtca aaagacctct atgccccacc tcttctctcc ctctgccctg ctgtgcctg	900
ggcaggggga gaacagcca cctcgtgact gggggctggc ccagcccgc ctatccctg	960
gggagggggc gggacagggg gagccctata attggacaag tctgggatcc ttgagtccta	1020

ctcagcccca gcggaggatga aggacgtcct tccccaggag ccggtgagaa gcgcagtcgg 1080
gggcacgggg atgagctcag gggcctctag aaagagctgg gaccttgga agccctggcc 1140
tccaggtagt ctcaggagag ctactcgggg tcgggcttgg ggagaggagg agcgggggtg 1200
aggcaagcag caggggactg gacctgggaa gggctgggca gcagagacga cccgaccgc 1260
tagaaggtag ggtggggaga gcagctggac tgggatgtaa gccatagcag gactccacga 1320
gttgtcacta tcatttatcg agcacctact ggggtgtccc agtgtcctca gatctcata 1380
actggggagc caggggcagc gacacggtag ctagccgtcg attgga 1426

<210> 6
<211> 1505
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 6
gctggtcgga ggctcgcagt gctgtcggcg agaagcagtc gggtttgag cgcttgggtc 60
gcgttgggtc gcggtggaac gcgcccaggg accccagttc ccgcgagcag ctccgcgccg 120
cgcttgagag actaagctga aactgtctgt cagctcccaa gatggtgcca cccaaattgc 180
atgtgctttt ctgcctctgc ggctgccttg ctgtggttta tccttttgac tggcaataca 240
taaactctgt tgcccatatg aaatcatcag catgggtcaa caaaatacaa gtactgatgg 300
ctgctgcaag ctttggccaa actaaaatcc cccggggaaa tgggccttat tccgttgggt 360
gtacagactt aatgtttgat cacactaata agggcacctt ctgtcgttta tattatccat 420
cccaagataa tgatcgcctt gacacccttt ggatcccaa taaagaatat ttttggggtc 480
ttagcaaatt tcttgggaaca cactggctta tgggcaacat tttagagttta ctctttggtt 540
caatgacaac tcctgcaaac tgggaattccc ctctgaggcc tggtgaaaaa tatccacttg 600
ttgttttttc tcatggctctt ggggcattca ggacacttta ttctgctatt ggcatgacc 660
tggcatctca tgggtttata gttgctgtg tagaacacag agatagatct gcatctgcaa 720

cttactatit caaggaccaa tctgctgcag aaatagggga caagtcttgg ctctacctta 780
gaaccctgaa acaagaggag gagacacata tacgaaatga gcaggtacgg caaagagcaa 840
aagaatgttc ccaagctctc agtctgattc ttgacattga tcatggaaag ccagtgaaga 900
atgcattaga tttaaagttt gatatggaac aactgaagga ctctattgat agggaaaaaa 960
tagcagtaat tggacattct ttgggtggag caacggttat tcagactcct agtgaagatc 1020
agagattcag atgtggtatt gccctggatg catggatgtt tccactgggt gatgaagtat 1080
attccagaat tcctcagccc ctctttttta tcaactctga atatttccaa tatcctgcta 1140
atatcataaa aatgaaaaaa tgctactcac ctgataaaga aagaaagatg attacaatca 1200
ggggttcagt ccaccagaat ttgctgact tcacttttgc aactggcaaa ataattggac 1260
acatgctcaa attaaaggga gacatagatt caaatgtagc tattgatcct agcaacaaag 1320
cttcattagc attcttacia aagcatttag gacttcataa agattttgat cagtgggact 1380
gcttgattga aggagatgat gagaatccta ttccaggagc caacattaac acaaccaatc 1440
aacacatcat gttacagaac tcttcaggaa tagagaaata caattaggat taaaataggt 1500
ttttt 1505

<210> 7

<211> 1419

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

gaattctgag ggcagagcgg gccactttct aggcctctga ttccatactg tgggtgtagt 60
tacttctgag aggacagctt gctgccagag ctctattttt tatgtttagag gctccttctg 120
cctgcagact ctgctgtctg ggaagggcac agcgtttaga gggagaggga ggtgtgagtc 180
cctccgtgga cccgctgctt tgtacttctc tatctcattt ccttttcagc accactctgg 240

gaaatcagta ttccagcccc attttatcct cagaaaattg aggcctcag atgttatctc 300
tgtagacctg gtcctattac gtgccaaagg catcatttaa gcctaagatg tcctggctcc 360
aagggtgcag catctggaag acaggcgcct catcctgcca tccctgctgc ggcttcactg 420
tggcccaggg gacatctcag cccgagaagg tcagcggccc cctcctggac caccgactcc 480
ccgcagaact cctctgtgcc ctctcctcac cagaccttgt tcctcccagt tgctcccaca 540
gccagggggc agtgagggt gctcttcccc cagccccact gaggaacca ggaagggtgaa 600
cgagagaatc agtcctgggt ggggctgggg agggccccag acatgagacc agctcctccc 660
ccaggggatg ttatcagtgg gtccagaggg caaaataggg agcctgggtg agggaggggc 720
aaaggcctcg ggctctgagc ggcttggcc ttctccacca accctccct acactcaggg 780
ggaggcggcg gtggggcaca cagggtgggg ggcgggtggc gggctgctgg gtgagcagca 840
ctgcctgcc tggattgaaa cccagagatg gaggtgctgg gaggggtgt gagagctcag 900
ccctgtaacc aggccttgcc ggagccactg atgccgggtc ttctgtgcct ttactccaaa 960
catccccag cccaagccac ccacttgttc tcaagtctga agaagaagtc cctcaccct 1020
ctactccagg ctgtgttcag ggcttggggc tgggtggagg aggggcctga aattccagt 1080
tgaaaggctg agatgccga gcccctggcc tatgtccaag ccatttcccc tctctacca 1140
gcctctccct ggggagccag tcagctagga aggaatgagg gctcccagg cccacccca 1200
gttcttgagc tcatctgggc tgcagggtg gcgggacagc agcgtggact cagtctccta 1260
gggatttccc aactctccg cccgcttgct gcatctggac accctgcctc aggcctcat 1320
ctccactggt cagcagggtga cctttgcca gcgccctggg tcctcagtgc ctgctgccct 1380
ggagatgata taaaacaggt cagaaccctc ctgcctgtc 1419

<210> 8

<211> 3074

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

gaattccggg gagcaggaag agccaacatg ctggccccgc gcggagccgc cgtcctcctg	60
ctgcacctgg tcctgcagcg gtggctagcg gcaggcgccc aggccacccc ccaggctctt	120
gaccttctcc catcttccag tcagaggcta aaccagggcg ctctgctgcc agtcctgaca	180
gaccccgccc tgaatgatct ctatgtgatt tccaccttca agctgcagac taaaagttca	240
gccaccatct tcggtcttta ctcttcaact gacaacagta aatattttga atttactgtg	300
atgggacgct taagcaaacg catcctccgt tacctgaaga acgatgggaa ggtgcatttg	360
gtggttttca acaacctgca gctggcagac ggaaggcggc acaggatcct cctgaggctg	420
agcaatttgc agcgaggggc cggctcccta gagctctacc tggactgcat ccagggtgat	480
tccgttcaca atctccccag ggcttttgct ggccccctcc agaaacctga gaccattgaa	540
ttgaggactt tccagaggaa gccacaggac ttcttggaag agctgaagct ggtggtgaga	600
ggctcactgt tccagggtggc cagcctgcaa gactgcttcc tgcagcagag tgagccactg	660
gctgccacag gcacagggga ctttaaccgg cagttcttgg gtcaaatgac acaattaaac	720
caactcctgg gagagggtgaa ggaccttctg agacagcagg ttaaggaaac atcatTTTTG	780
cgaaacacca tagctgaatg ccaggcttgc ggtcctctca agtttcagtc tccgacccca	840
agcacggtgg tcgccccggc tccccctgca ccgccaacac gccacctcg tcggtgtgac	900
tccaacccat gtttccgagg tgtccaatgt accgacagta gagatggctt ccagtgtggg	960
ccctgccccg agggctacac aggaaacggg atcacctgta ttgatgttga tgagtgcaa	1020
taccatccct gctacccggg cgtgcactgc ataaatttgt ctcttggtt cagatgtgac	1080
gcctgcccag tgggcttcac agggcccatg gtgcagggtg ttgggatcag ttttgccaag	1140
tcaacaagc aggtctgcac tgacattgat gagtgtcgaa atggagcgtg cgttcccaac	1200
tcgatctgcg ttaatacttt gggatcttac cgctgtgggc cttgtaagcc ggggtatact	1260

ggatgacaga taaggggatg caaagtggaa agaaactgca gaaaccaga gctgaaccct 1320
tgcagtgtga atgccagtg cattgaagag aggcaggggg atgtgacatg tgtgtgtgga 1380
gtcggttggg ctggagatgg ctatatctgt ggaaaggatg tggacatcga cagttacccc 1440
gacgaagaac tgccatgctc tgccaggaac tgtaaaaagg acaactgcaa atatgtgcca 1500
aatcttggcc aagaagatgc agacagagat ggcatgtggc acgcttgtga cgaggatgct 1560
gacggagatg ggatcctgaa tgagcaggat aactgtgtcc tgattcataa tgtggaccaa 1620
aggaacagcg ataaagatat ctttggggat gcctgtgata actgcctgag tgtcttaaat 1680
aacgaccaga aagacaccga tggggatgga agaggagatg cctgtgatga tgacatggat 1740
ggagatggaa taaaaacat tctggacaac tgccaaaat ttcccaatcg tgaccaacgg 1800
gacaaggatg gtgatggtgt gggggatgcc tgtgacagtt gtcctgatgt cagcaaccct 1860
aaccagtctg atgtggataa tgatctggtt ggggactcct gtgacaccaa tcaggacagt 1920
gatggagatg ggcaccagga cagcacagac aactgcccc cgtcattaa cagtgccag 1980
ctggacaccg ataaggatgg aattggtgac gagtgtgatg atgatgatga caatgatggt 2040
atcccagacc tggtgcccc tggaccagac aactgccggc tgggtcccaa cccagcccag 2100
gaggatagca acagcgacgg agtgggagac atctgtgagt ctgactttga ccaggaccag 2160
gtcatcgatc ggatcgacgt ctgccagag aacgcagagg tcaccctgac cgacttcagg 2220
gcttaccaga ccgtgggcct ggatcctgaa ggggatgcc agatcgatcc caactgggtg 2280
gtcctgaacc agggcatgga gattgtacag accatgaaca gtgatcctgg cctggcagtg 2340
gggtacacag cttttaatgg agttgacttc gaaggacct tccatgtgaa taccagaca 2400
gatgatgact atgcaggctt tatctttggc taccaagata gctccagctt ctacgtggtc 2460
atgtggaagc agacggagca gacatatgg caagccacc cattccgagc agttgcagaa 2520
cctggcattc agctcaaggc tgtgaagtct aagacaggtc caggggagca tctccggaac 2580

tccctgtggc acacggggga caccagtac caggtcaggc tgctgtggaa ggactccagg 2640
aatgtgggct ggaaggacaa ggtgtcctac cgctgggtcc tacagcacag gccccagggt 2700
ggctacatca gggtagcatt ttatgaaggc tctgagttgg tggctgactc tggcgtcacc 2760
atagacacca caatgcgtgg aggccgactt ggcgttttct gcttctctca agaaaacatc 2820
atctgggtcca acctcaagta tcgctgcaat gacaccatcc ctgaggactt ccaagagttt 2880
caaaccaga atttcgaccg cttcgataat taaaccaagg aagcaatctg taactgcttt 2940
tcggaacact aaaaccatat atatitaaac ttcaattttc tttagctttt accaaccxaa 3000
atatatcaaa acgttttatg tgaatgtggc aataaaggag aagagatcat ttttaaaaaa 3060
aaaaaaaaaa aaaa 3074

<210> 9
<211> 1327
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 9
gatccccaga gactttccag atatctgaag aagtcctgat gtcactgccc cggtccttcc 60
ccaggtagag caacactcct cgtcgcaacc caactggctc cccttacctt ctacacacac 120
acacacacac acacacacac acacacacac acacacaaat ccaagacaac actactaagg 180
cttcitttggg agggggaagt agggataggt aagaggaaag taagggacct cctatccagc 240
ctccatggaa tcctgacttc ttttccttgt tatttcaact tcttccacc catcttttaa 300
acttttagact ccagccacag aagcttaca ctaaaagaaa ctctaaggcc aatttaatcc 360
aaggtttcat tctatgtgct ggagatgggt tacagtaggg tgaggaaacc aaattctcag 420
ttggcactgg tgtacccttg tacaggtagt gtaacatctc tgtgcctcag tttgctcact 480
ataaaataga gacggtaggg gtcatggtag gcactacctg actagcatat aagaagcttt 540

cagcaagtgc agactactct taccacttc cccaagcac agttgggtg ggggacagct 600
gaagaggtgg aaacatgtgc ctgagaatcc taatgaaatc ggggtaaagg agcctggaac 660
acatcctgtg accccgcctg tcctgtagga agccagtctc tggaaagtaa aatggaaggg 720
ctgcttggga actttgagga tatttagccc accccctcat ttttacttgg ggaaactaag 780
gcccagagac ctaagggtgac tgcctaagtt agcaaggaga agtcttgggt atcatccca 840
ggttgggggg acccaattat ttctcaatcc cattgtattc tggaatgggc aatttgtcca 900
cgtcactgtg acctaggaac acgcgaatga gaaccacag ctgagggcct ctgcgcacag 960
aacagctgtt ctccccagga aatcaacttt ttttaattga gaagctaaaa aattattcta 1020
agagaggtag cccatcctaa aaatagctgt aatgcagaag ttcattgtca accaatcatt 1080
tttgcttacg atgcaaaaat tgaaaactaa gtttattaga gaggttagag aaggaggagc 1140
tctaagcaga aaaaatcctg tgccgggaaa ccttgattgt ggctttttaa tgaatgaaga 1200
ggcctccctg agcttacaat ataaaagggg gacagagagg tgaaggctca cacatcaggg 1260
gcttgctctt gcaaaaccaa accacaagac agacttgcaa aagaaggcat gcacagctca 1320
gcactgc 1327

<210> 10
<211> 2376
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 10
tctagaaatg tctgcatgat ttttggattt ttgactttt aatttacctg ttgacattt 60
gctatgagcc tticactcat aactaatata ttatttagtt ctctaagtaa ttttgggtta 120
cctactatat atcagatacc atgctaagta ctaggaatac agaatcaaat gaggcattgt 180
ccataccctc aagtagctta cattagaatg agagagacag ataaaccatt tcactacagt 240
tcagtgtgga aaatagagta gcagaggcag gtacaaggta ccattgaaca atgattaatg 300

actcttcctg ggacttggga aacatcttcc agggaagtcg tcgaagctgt tttaaaatat 360
agcaaacttt tgtatttagt tcaggaacag catggcccat ttgccaatc acatcttaac 420
agttggaaaa gcaaacatat tatctatcag gctttcctct aaactttaaa tatgttttat 480
aagttataac tccagagaaa atttacaag gataaacctt aatatagaag gaattagagc 540
tgccacagct tctacacttt taacctctca atattttatc tgttgggctc cactgtttct 600
tcctggaaatt cacatcacig ccaccactct gtctctcttg tccicatatc aatgtggcca 660
aatattttcc ctgtatttca atcaggacaa gacatggitt tttccccca tcaaaggaat 720
ggagaaccat agaatactag ttttaaaatg tctttaggcc aggtgccgtg acccatgtct 780
gtaatcctag cactttgaga ggttgaggca ggagaatcac ttgatccag agctcgaaac 840
cagcctgggc aacatagtga aacctctgic tctatTTTT aaataaaatt tgaaaaagtc 900
tttagacata atctagtcta aaaatgaagg cttaaattgt atgtatagcc ccctgccaa 960
tggctatcac ctgtgtgggc atcttcagtc atagggatct tattgccaca gagaaatccc 1020
tttaaaactta ttgggtaaaa tctctccaat gtttattaag aaacacacaa aaaataaagc 1080
aaagaagaaa atgcaaaaga gttataaatg agaggaagca aaatgggcac ttattaaagg 1140
tctaataaat gcacatttgt atccatcatt ctactgagtt ctactccca agatgttctt 1200
ccctttagca aacaaataag caagtcagca aagaaagaaa gaacaaacaa aatgtggtga 1260
tcaggaagc attgaggaga tggatggtag caggtggcaa gaggactata aaagttttac 1320
aaaatgtctt cctctgaata tgtttagagt ctgtcattca agcatttatt atacaccaat 1380
aatgtgagca acactttact tgacaaagaa acagaaaaga aaggaaagga agaaaacaga 1440
agagcatgaa gagaaaattt aggatggatt ctgttcttca acttcaaagc atctgctaata 1500
ttgaatttag ggaggagggg aaaaggttga aagagaataa gacatgtgta gaagacaagg 1560
acagagagaa tttcagtcgg gtaagcaatg taattcattt caattctaca actatttatg 1620

gagcagctac gtgggcccac caccatttaa taaattgggt acagaattaa aaccaacca 1680
aagggaatat acitccttct tttcacaga cctctttgt tctattctgc ccatgagggt 1740
ttcctcctca agaaccagca aatccaacga cagtcaatag caggcattac aaatcagatt 1800
cagaaaaata aatcacccct tctaaatttc ttctagatat tatcttttat gttttgagta 1860
taattgtata tagtatagac tatagctatg tatgtacact ttccacttac atcttttatt 1920
tgcttttata atgtcttctt taaaataaaa ctgcttttag aagttctgca caattctgat 1980
ttttaccaag tcaacctact tcttctctca aaaggacaaa cataaattgt ctagtgaatt 2040
ccagtcaatt ttccagaag aaaaaaatg ctccagtttt ctctcttacc aagacaggaa 2100
gcacttcctg gagattaatc actgtgttgc ctgcaaaaat tgggaagggt gagagaaatt 2160
agtaaagtag gtgtatcat cctacttga atttggaaatg ttggaaatg gtctgtctgc 2220
catttggatg aaagcaagga tgagtcaagc tgcgggtgat ccaacaaac actgtcactc 2280
tttaaaagct gcgctcccga ggttggacct acaaggaggc aggcaagaca gcaaggcata 2340
gagacaacat agagctaagt aaagccagtg gaaatg 2376

<210> 11
<211> 959
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 11
aagcttttac catggttaacc cctggtcccg tttagccacc accacccac ccagcacacc 60
tccaacctca gccagacaag gtgttgaca caagagagcc cttaggggca cagagagagt 120
ctggacacgt gggggagtca gccgtgtatc atcggaggcg gccgggcaca tggcagggat 180
gagggaaaga ccaagagtcc tctgttgggc ccaagtccta gacagacaaa acctagacaa 240
tcacgtggct ggctgcatgc cctgtggctg ttgggctggg ccagaggaga gggaggggcg 300

ctctttcctg gaggtgggtcc agagcaccgg gtggacagcc ctgggggaaa acttccacgt 360
tttgatggag gttatctttg ataactccac agtgacctgg ttcgccaaag gaaaagcagg 420
caaacgtgag ctgttttttt tttctccaag ctgaacacta ggggtcctag gctttttggg 480
tcacccggca tggcagacag tcaacctggc aggacatccg ggagagacag acacaggcag 540
agggcagaaa ggtcaaggga ggttctcagg ccaaggctat tggggtttgc tcaattgttc 600
ctgaatgctc ttacacacgt acacacacag agcagcacac acacacacac acacatgcct 660
cagcaagtcc cagagaggga ggtgtcgagg gggacccgct ggctgttcag acggactccc 720
agagccagtg agtgggtggg gctggaacat gagttcatct atttcctgcc cacatctggt 780
ataaaaggag gcagtggccc acagaggagc acagctgtgt ttggctgcag ggccaagagc 840
gctgtcaaga agaccacac gccccctcc agcagctgaa ttctgcagc tcagcagccg 900
ccgccagagc aggacgaacc gccaatcgca aggcacctct gagaacttca ggtaggaga 959

<210> 12
<211> 2480
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 12
gacgtctgt gccttcggag gtctttctgc ctgcctgtcc tcatgcctct cctcctcttg 60
ctgctcctgc tgccaagccc cttacacccc caccctatct gtgaggcttc caaagtggcc 120
agccacctag aagtgaactg tgacaagagg aatctgacag cgctgcctcc agacctgccg 180
aaagacacaa ccatcctcca cctgagttag aacctcctgt acaccttctc cctggcaacc 240
ctgatgcctt acactgcct cactcagctg aacctagata ggtgcgagct caccaagctc 300
caggctgatg ggacgctgcc agtgctgggg accctggatc tatcccacaa tcagctgcaa 360
agcctgcctt tgctagggca gacactgcct gctctcaccg tcctggacgt ctccttcaac 420
cggtgacct cgctgcctct tggcgccctg cggtgtcttg gcgaactcca agagctctac 480

ctgaaaggca atgagctgaa gaccttgccc ccagggtccc tgacgcccac acccaagctg 540
gagaagctca gtctggctaa caacaacttg actgagctcc ccgctgggct cctgaatggg 600
ctggagaatc tcgacaccct tctcctccaa gagaactcgc tgtatacaat accaaagggc 660
ttttttgggt cccacctcct gccttttgct tttctccacg ggaacccctg gttatgcaac 720
tgtgagatcc tctattttcg tcgctggctg caggacaatg ctgaaaatgt ctacgtatgg 780
aagcaagggtg tggacgtcaa ggccatgacc tctaactggg ccagtgtgca gtgtgacaat 840
tcagacaagt ttcccgctca caaatacca ggaaaggggt gccccaccct tggatgatga 900
ggtgacacag acctatatga ttactacca gaagaggaca ctgagggcga taaggctcgt 960
gccacaagga ctgtgggtcaa gtccccacc aaagcccata caacccctg gggtctattc 1020
tactcatggt ccactgcttc tctagacagc caaatgccct cctccttgca tccaacacaa 1080
gaatccacta aggagcagac cacattccca cctagatgga ccccaaattt cacacttcac 1140
atggaatcca tcacattctc caaaactcca aaatccacta ctgaaccaac cccaagcccg 1200
accacctcag agcccgctcc ggagcccgcc ccaaactga ccacctgga gccactcca 1260
agcccgacca cccagagcc caccctcagc ccgccccca gcccgaccac cccggagccc 1320
accccaatcc cgaccatgc cacaagcccg accatcctgg tgtctgccac aagcctgatc 1380
actccaaaaa gcacattttt aactaccaca aaaccggtat cactcttaga atccacaaa 1440
aaaaccatcc ctgaacttga tcagccacca aagctccgtg gggtgctcca agggcatttg 1500
gagagctcca gaaatgaccc tttctccac ccgactttt gctgcctcct cccctgggc 1560
ttctatgtct tgggtctctt ctggctgctc ttgacctg tggtcctcat cctgctgctg 1620
agctgggttg ggcatgtgaa accacaggcc ctggactctg gccaaagggtc tgctctgacc 1680
acagccacac aaaccacaca cctggagctg cagaggggac ggcaagtgc agtccccgg 1740
gcctggctgc tcttcttcg aggttcgctt cccactttcc gctccagcct ctctctgtgg 1800

gtacggccta atggccgtgt ggggcctcta gtggcaggaa ggaggccctc agctctgagt 1860
cagggtcgtg gtcaggacct gctgagcaca gtgagcatta ggtactctgg ccacagcctc 1920
tgaggggtgg aggtttgggg accttgagag aagagcctgt gggctctcct attggaatct 1980
agttgggggt tggaggggta aggaacacag ggtgataggg gaggggtctt agttcctttt 2040
tctgtatcag aagccctgtc ttcacaacac aggcacacaa tttcagtccc agccaaagca 2100
gaaggggtaa tgacatggac ttggcggggg gacaagacaa agctcccgat gctgcatggg 2160
gcgctgccag atctcacggt gaaccatttt ggcagaatac agcatgggtc ccacatgcat 2220
ttatgcacag aagaaaatct ggaaagtgat ttatcaggat gtgagcactc gttgtgtctg 2280
gatgttaciaa atatgggtgg ttttattttc ttttccctg tttagcattt tctagttttc 2340
ttatcaggat gtgagcactc gttgtgtctg gatgttaciaa atatgggtgg ttttattttc 2400
ttttccctg tttagcattt tctagttttc cactattatt gtataattatc tgtataataa 2460
aaaataattt tagggttggg 2480

<210> 13
<211> 1337
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 13
cccccgacca tggcgaagct gattgcgctc accctcttgg ggaatgggact ggcactcttc 60
aggaaccacc agtcttctta ccaaacacga cttaatgctc tccgagaggt acaaccgta 120
gaacttccta actgtaattt agttaagga atcgaaactg gctctgaaga catggagata 180
ctgcctaatg gactggcitt cattagctct ggattaaagt atcctggaat aaagagcttc 240
aaccccaaca gtccctggaaa aatacttctg atggacctga atgaagaaga tccaacagtg 300
ttggaattgg ggaatcactgg aagtaaattt gatgtatctt catttaacct tcatgggatt 360

agcacattca cagatgaaga taatgccatg tacctcctgg tggagaacca tccagatgcc 420
 aagtcacag tggagtgtt taaatttcaa gaagaagaaa aatcgctttt gcatctaaaa 480
 accatcagac ataaacttct gcctaatttg aatgatattg ttgctgtggg acctgagcac 540
 ttttatggca caaatgatca ctattttctt gaccctact tacaatcctg ggagatgtat 600
 ttgggtttag cgtggtcgta tgttgtctac tatagtccaa gtgaagttag agtgggtggca 660
 gaaggatttg attttgctaa tggaaatcaac atttcacccg atggcaagta tgtctatata 720
 gctgagttgc tggctcataa gattcatgtg tatgaaaagc atgctaattg gactttaact 780
 ccattgaagt ccttgactt taataccctc gtggataaca tatctgtgga tcctgagaca 840
 ggagaccttt gggttggatg ccatcccaat ggcatgaaaa tcttcttcta tgactcagag 900
 aatcttcctg catcagaggt gcttcgaatc cagaacattc taacagaaga acctaaagtg 960
 acacaggttt atgcagaaaa tggcacagtg ttgcaaggca gtacagttgc ctctgtgtac 1020
 aaagggaaac tgcgtattgg cacagtgttt cacaagctc tttactgtga gctctaacag 1080
 accgatttgc acctatgcca tagaaactga ggccattatt tcaaccgctt gccatattcc 1140
 gaggaccag tgttcttagc tgaacaatga atgctgacct taaatgtgga catcatgaag 1200
 catcaaagca ctgtttaact gggagtgaata tgaatgttag ggcttttttt tgagaatata 1260
 ctatcaaatc agtcttggaa tacttgaaaa cctcatttac cataaaaaatc cttctcacta 1320
 aatggataa atcagtt 1337

<210> 14
 <211> 5515
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 14
 ggaacttgat gctcagagag gacaagtcatttggcccaagg tcacacagct ggcaactggc 60
 agacgagatt cagccctgg caatttgact ccagaatcct aaccttaacc cagaagcacg 120

gcttcaagcc ctggaaacca caatacctgt ggcagccagg gggagggtgt ggaatctcat 180
ttcacatgtg gggagggggc tctgtgtctc aaggtcacaa ccaaagagga agctgtgatt 240
aaaaccagg tccatttgc aaagcctcga cttttagcag gtgcatcata ctgttccac 300
ccctcccatc ccacttcgtt ccagccgcct agccccactt tctttttttt ctttttttga 360
gacagtctcc ctcttgctga ggctggagtg cagtggcgag atctcggtc actgtaacct 420
ccgcctccc ggttcaagcg attctcctgc ctacgctcc caagtagcta ggattacagg 480
cgcccgccac cagcctggc taacttttgt attttagta gagatgggtt ttcacatgt 540
tggccaggct ggtctcaaac tctgacctt aagtgttcg cccactgtgg cctcccaaag 600
tgctgggatt acaggcgtga gctaccgcc ccagccctc ccatccact tctgtccagc 660
cccctagccc tactttcttt ctgggatcca ggagtccaga tccccagccc cctctccaga 720
ttacattcat ccaggcacag gaaaggacag ggtcaggaaa ggaggactct gggcggcagc 780
ctccacattc ccttccacg ctggccccc agaatggagg aggtgtctg tattactggg 840
cgagggtgcc tcccttctg gggactgtgg ggggtggtca aaagacctt atgcccacc 900
tccttctcc ctctgccctg ctgtgcctgg ggcaggggga gaacagcca cctctgact 960
gggctgccc gcccgcccta tccctggggg agggggcggg acagggggag ccctataatt 1020
ggacaagtct gggatcctt agtcctactc agccccagcg gaggtaagg acgtccttcc 1080
ccaggagccg gtgagaagcg cagtcggggg cacgggatg agctcaggg cctctagaaa 1140
gagctgggac cctgggaagc cctggcctcc aggtagtctc aggagagcta ctgggggtcg 1200
ggcttgggga gaggaggagc ggggtgagg caagcagcag gggactggac ctgggaaggg 1260
ctgggcagca gagacgacct gaccgctag aaggtaggg gggagagca gctggactgg 1320
gatgtaagcc atagcaggac tccacgagtt gtcactatca ttatcgagca cctactgggt 1380
gtccccagt tctcagatc tccataactg gggagccagg ggcagcgaca cggtagctag 1440

ccgtcgattg gagaacttta aaatgaggac tgaattagct cataaatgga acacggcgct 1500
taactgtgag gttaggagctt agaatgtgaa gggagaatga ggaatgagag actgggactg 1560
agatggaacc ggcggtgggg aggggggtggg gggatggaat ttgaaccccg ggagaggaag 1620
atggaatfff ctatggaggc cgacctgggg atggggagat aagagaagac caggagggag 1680
ttaaataggg aatgggttgg gggcggcttg gtaaatgtgc tgggattagg ctgttcaga 1740
taatgcaaca aggcttgaa ggctaacctg gggtagggcc gggttggggg cgctgggggt 1800
gggaggagtc ctactggcg gtgattgac agtttctcct tcccagact ggccaatcac 1860
aggcaggaag atgaaggttc tgtgggctgc gtgtctgtc acattcctgg caggtatggg 1920
ggcggggctt gctcggttcc ccccgctcct cccctctca tctcacctc aacctcctgg 1980
ccccattcag acagacctg ggccccctct tctgaggctt ctgtgctgt tctggctct 2040
gaacagcgat ttgacgctct ctgggcctcg gtttcccca tccttgagat aggagttaga 2100
agtgttttg ttgttgttgt ttgttgttgt tgtttgttt ttttgagatg aagtctcgct 2160
ctgtcgccca ggctggagtg cagtggcggg atctcggtc actgcaagct ccgctccca 2220
ggtccacgcc attctcctgc ctacgctcc caagtagctg ggactacagg cacatgccac 2280
cacaccgac taactttttt gtattttcag tagagacggg gtttcacat gttggccagg 2340
ctggtctgga actcctgacc tcaggatgc tggcggttc gatctccaa agtctggga 2400
ttacaggcgt gagccaccgc acctggctgg gagttagagg tttctaagc attgcaggca 2460
gatagtgaat accagacacg gggcagctgt gatctttatt ctccatcac cccacacagc 2520
cctgcctggg gcacacaagg aactcaata catgctttc cgctgggccc gtggctcacc 2580
cctgtaatcc cagcacttg ggaggccaag gtgggaggat cacttgagcc caggagtta 2640
acaccagcct gggcaacata gtgagacct gtctctacta aaaatacaaa aattagccag 2700
gcatggtgcc acacacctgt gctctcagct actcaggagg ctgaggcagg aggatcgctt 2760

gagcccagaa ggtcaagggt gcagtgaacc atgttcaggc cgctgcactc cagcctgggt 2820
gacagagcaa gaccctgttt ataaatacat aatgctttcc aagtgattaa accgactccc 2880
ccctcaccct gccaccatg gctccaaaga agcatttgtg gagcaccttc tgtgtgcccc 2940
taggtagcta gatgcctgga cggggtcaga aggaccctga cccgaccttg aacttgtttc 3000
acacaggatg ccaggccaag gtggagcaag cggtagagac agagccggag cccgagctgc 3060
gccagcagac cgagtggcag agcggccagc gctgggaact ggcactgggt cgcttttggg 3120
attacctgcg ctgggtgcag acactgtctg agcagggtga ggaggagctg ctcagctccc 3180
aggtcaccca ggaactgagg tgagtgtccc catcctggcc ctgaccctc ctggtgggcg 3240
gctatacctc ccagggtcca ggtttcattc tgccccgtc gctaagtctt ggggggcctg 3300
ggtctctgct ggttctagct tcctcttccc attctgact cctggcttta gctctctgga 3360
attctctctc tcagctttgt ctctctctct tccctctga ctcagtctct cacactcgtc 3420
ctggctctgt ctctgtcctt ccctagctct tttatataga gacagagaga tggggctca 3480
ctgtgttgcc caggctggc ttgaactctt gggctcaagc gatcctccg cctcggcctc 3540
ccaaagtgtt gggattagag gcatgagcac ctgcccggc ctccctagctc cttcttcgtc 3600
tctgccctctg cctctgcat ctgctctctg catctgtctc tgtctcctc tctcggcctc 3660
tgccccgttc cttctctccc tcttgggtct ctctggctca tccccatctc gcccgcccca 3720
tcccagccct tctccccgc ctccccactg tgcgacacc tcccgcctc tcggccgcag 3780
ggcgtgatg gacgagacca tgaaggagt gaaggcctac aaatcggaac tggaggaaca 3840
actgaccccg gtggcggagg agacgcgggc acggctgtcc aaggagctgc aggcggcgca 3900
ggccccgctg ggcgcggaca tggaggacgt gcgcggccgc ctggtgcagt accgcggcga 3960
ggtgcaggcc atgctcggcc agagcaccga ggagctgcgg gtgcgcctcg cctcccacct 4020
gcgcaagctg cgtaagcggc tcctccgcga tgccgatgac ctgcagaagc gcctggcagt 4080

gtaccaggcc ggggcccgcg agggcgccga gcgcggcctc agcgccatcc gcgagcgctt 4140
ggggcccctg gtggaacagg gccgcgtgcg ggccgccact gtgggctccc tggccggcca 4200
gccgctacag gagcggggcc aggcctgggg cgagcggctg cgcgcgcgga tggaggagat 4260
gggcagccgg acccgcgacc gcctggacga ggtgaaggag caggtggcgg aggtgcgcgc 4320
caagctggag gagcaggccc agcagatacg cctgcaggcc gaggccttcc aggcccgctt 4380
caagagctgg ttcgagcccc tggtggaaga catgcagcgc cagtgggccc ggctgggtga 4440
gaagggtcag gctgccgtgg gcaccagcgc cggccctgtg cccagcgaca atcactgaac 4500
gccgaagcct gcagccatgc gacccacgc caccctgtc ctctgcctc cgcgagcctt 4560
gcagcgggag accctgtccc cgcccagcc gtcctcctgg ggtggaccct agtttaataa 4620
agattacca agtttcacgc atctgtggc ctccccctgt gatttcctct aagccccagc 4680
ctcagtttct ttttctgcc acatactgcc acacaattct cagccccctc ctctccatct 4740
gtgtctgtgt gtatctttct ctctgccctt tttttttt tagacggagt ctggctctgt 4800
caccaggct agagtgcagt ggcacgatct tggctcactg caacctctgc ctcttgggtt 4860
caagcgattc tgctgcctca gtagctggga ttacaggctc acaccaccac acccggttaa 4920
ttttgtatt tttagtagag acgagctttc accatgttgg ccaggcaggt ctcaaactcc 4980
tgaccaagt atccaccgc cggcctcca aagtgtgag attacaggcc tgagccacca 5040
tgccggcct ctgcccctct ttcttttita gggggcaggg aaaggctca ccctgtcacc 5100
cgccatcaca gctcactgca gcctccacct cctggactca agtgataagt gatcctccg 5160
cctcagcctt tccagtagct gagactacag gcgcatacca ctaggattaa ttggggggg 5220
ggtggtgtgt gtggagatgg ggcttggtt tgttgccag gctgatgtgg aattcctggg 5280
ctcaagcat actccacct tggcctctg agtagctgag actactggct agcaccacca 5340
caccagctt ttattattia ttttagaga caaggctca atatgttgc caggctagtc 5400

tcaaaccct ggctcaagag atcctccgcc atcggcctcc caaagtgtg ggattccagg 5460

catgggctcc gagcggcctg cccaacttaa taatattgtt cctagagttg cactc 5515

<210> 15

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<220>

<221> misc_feature

<222> (17)..(17)

<223> n stands for any base

<400> 15

ctcagaatgg ccaaaancc

19

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<220>

<221> misc_feature

<222> (18)..(18)

<223> n stands for any base

<400> 16

cctcagaatg gccaaaantc

20

<210> 17

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 17

gcagagctgc tgggacga

18

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<220>

<221> misc_feature

<222> (18)..(18)

<223> n stands for any base

<400> 18

ggccctgtct tcgttaangg

20

<210> 19

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(20)

<223> n stands for any base

<400> 19

atggccctgt cttcgtaan tg

22

<210> 20
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 20
ccagggctat ggaagtcgag tatc 24

<210> 21
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<220>
<221> misc_feature
<222> (16)..(16)
<223> n stands for any base

<400> 21
accacggcgg tcatgngc 18

<210> 22
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<220>
<221> misc_feature
<222> (16)..(16)
<223> n stands for any base

<400> 22
accacggcgg tcatgnac

18

<210> 23
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 23
gcagcaaagg agtcccgagt

20

<210> 24
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<220>
<221> misc_feature
<222> (16)..(16)
<223> n stands for any base

<400> 24
cggcagcttc ttccnccg

18

<210> 25
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<220>
<221> misc_feature
<222> (16)..(16)
<223> n stands for any base

<400> 25
cggcagcttc ttcccntg 18

<210> 26
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 26
ccacccctca gctataaata gg 22

<210> 27
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(19)
<223> n stands for any base

<400> 27
gaatggagga ggggtgtctng a 21

<210> 28
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(20)
<223> n stands for any base

<400> 28
agaatggagg aggtgtctn ta 22

<210> 29
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 29
ccaggaaggg aggacacctc 20

<210> 30
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(19)
<223> n stands for any base

<400> 30
ttcttttggt ggagcaacng t 21

<210> 31
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(20)
<223> n stands for any base

<400> 31
attcttttgg tggagcaacn tt 22

<210> 32
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 32
tcttacctga atctctgac ttca 24

<210> 33
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<220>
<221> misc_feature
<222> (16)..(16)
<223> n stands for any base

<400> 33
cggagccact gatgcncg

18

<210> 34
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<220>
<221> misc_feature
<222> (16)..(16)
<223> n stands for any base

<400> 34
cggagccact gatgcntg

18

<210> 35
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 35
tgtttggagt aaaggcacag aa

22

<210> 36
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<220>
<221> misc_feature

<222> (17)..(17)

<223> n stands for any base

<400> 36

cgagtggga acgcacnct

19

<210> 37

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<220>

<221> misc_feature

<222> (17)..(17)

<223> n stands for any base

<400> 37

cgagtggga acgcacngt

19

<210> 38

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 38

ggtctgcact gacattgatg ag

22

<210> 39

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<220>

<221> misc_feature

<222> (22)..(22)

<223> n stands for any base

<400> 39

tacccttgta caggtgatgt anta

24

<210> 40

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<220>

<221> misc_feature

<222> (22)..(22)

<223> n stands for any base

<400> 40

tacccttgta caggtgatgt anca

24

<210> 41

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 41

atagtggaca aactgaggca ca

22

<210> 42

<211> 22

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(20)
<223> n stands for any base

<400> 42
cagagactgg cttcctacan ga 22

<210> 43
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<220>
<221> misc_feature
<222> (21)..(21)
<223> n stands for any base

<400> 43
ccagagactg gcttcctaca nta 23

<210> 44
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 44
gcctggaaca catcctgtga 20

<210> 45
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<220>
<221> misc_feature
<222> (17)..(17)
<223> n stands for any base

<400> 45
tttgatgggg ggaaaanac

19

<210> 46
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<220>
<221> misc_feature
<222> (16)..(16)
<223> n stands for any base

<400> 46
ttgatggggg gaaaancc

18

<210> 47
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 47

cctcatatca atgtggccaa

20

<210> 48

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 48

ggcacagaga gagtctggac acg

23

<210> 49

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 49

ggccgcctcc gatgataca

19

<210> 50

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<220>

<221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> n stands for any base

<400> 50
cccagggtc ctgncg

16

<210> 51
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(15)
<223> n stands for any base

<400> 51
ccccagggt cctgntg

17

<210> 52
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 52
tgagcttctc cagcttgggt g

21

<210> 53
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<220>
<221> misc_feature

<222> (22)..(22)

<223> n stands for any base

<400> 53

acccaaatac atctcccagg ancg

24

<210> 54

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<220>

<221> misc_feature

<222> (22)..(22)

<223> n stands for any base

<400> 54

aacccaaata catctcccag gnct

24

<210> 55

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 55

gaatgatatt gttgctgtgg gac

23

<210> 56

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<220>

<221> misc_feature

<222> (17)..(17)

<223> n stands for any base

<400> 56

ccgatgacct gcagaancg

19

<210> 57

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<220>

<221> misc_feature

<222> (18)..(18)

<223> n stands for any base

<400> 57

gccgatgacc tgcagaantg

20

<210> 58

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 58

cggcctggta cactgccag

19

<210> 59

<211> 19

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Probe

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> n stands for any base

<400> 59
agccactgat gcncggtct 19

<210> 60
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Probe

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> n stands for any base

<400> 60
agccactgat gcntggtct 19

<210> 61
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Probe

<220>
<221> misc_feature

<222> (16)..(16)
<223> n stands for any base

<400> 61
agtacaggtg atgtantatc tctgtg

26

<210> 62
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Probe

<220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(15)
<223> n stands for any base

<400> 62
gtacaggtga tgtancatct ctgtg

25

<210> 63
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Probe

<400> 63
tggacacgtg ggggagtcag

20

<210> 64
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Probe

<400> 64

tggacacgtg gggagtcagc

20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/03477

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/09, C12Q1/68, G01N33/50, G01N33/53, A61K48/00,
A61P9/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/09, C12Q1/68, G01N33/50, G01N33/53, A61K48/00,
A61P9/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
GenBank/EMBL/DDBJ/Geneseq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG),
MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Kumari, S. et al., Functional expression and biophysical properties of polymorphic variants of the human gap junction protein connexin37., Biochem.Biophys.Res.Comm., Vol.274(1), pages 216 to 224, (2000)	1,7,10
Y	Dupont, E. et al., Altered connexin expression in human congestive heart failure. J.Mol.Cell Cardiol., Vol.33(2), pages 359 to 371, (2001)	1,7,10
Y	Kumari, S. et al., Two polymorphic variants of human connexin37 exhibit different biophysical properties, Mol.Biol.Cell, Vol.9, Suppl., pp.93a 538, (1998)	1,7,10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
08 July, 2003 (08.07.03)

Date of mailing of the international search report
22 July, 2003 (22.07.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/03477

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Reed, K.E. et al., Molecular cloning and functional expression of human connexin37, an endothelial cell gap junction protein., J.Clin. Invest., Vol.91(3), pages 997 to 1004, (1993)	1,7,10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/03477

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 4-6

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The inventions as set forth in these claims pertain to diagnostic methods to be practiced on the human body.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
(See extra sheet.)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
The parts in claims 1, 7 and 10 relating to the polymorphism (1).

Remark on Protest

☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐

No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box No.II of continuation of first sheet(1)

The gene polymorphisms as set forth in (1) to (15) which are described in the claims are common to each other in being usable in diagnosing the risk of myocardial infarction.

As reported by the documents 1 to 3 cited below, however, it had been publicly known before the application of the present case that gene polymorphisms of angiotensin-converting enzyme (ACE), gene polymorphisms in platelet glycoprotein receptor and gene polymorphisms in blood coagulation factor VII respectively relate to myocardial infarction. Therefore, that fact that the gene polymorphisms are usable in diagnosing the risk of myocardial infarction cannot be considered as a special technical feature in the meaning as described in PCT Rule 13.2.

According to PCT Rule 13.3, the determination of unity of invention shall be made without regard to whether the inventions are claimed in separate claims or as alternatives within a single claim.

Such being the case, the inventions relating to the gene polymorphisms (1) to (15), among the inventions as described in the claims, cannot be considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept and it is recognized that the present application has 15 inventions corresponding to the 15 types of gene polymorphisms as set forth in (1) to (15).

- Document 1: Cambien F. et al.,
Deletion polymorphism in the gene for
angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor
for myocardial infarction.
Nature, Vol. 359, No. 6396, pp. 641-644 (1992)
- Document 2: Weiss, E.J. et al.,
A polymorphism of a platelet glycoprotein receptor as
an inherited risk factor for coronary thrombosis.
N. Engl. J. Med., Vol. 334, No. 17, pp. 1090-1094 (1996)
- Document 3: Iacovjello L. et al.,
polymorphism in the coagulation factor VII gene and the
risk of myocardial infarction.
N. Engl. J. Med., Vol. 338, No.2, pp. 79-85 (1998)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12N15/09, C12Q1/68, G01N33/50, G01N33/53, A61K48/00, A61P9/10

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12N15/09, C12Q1/68, G01N33/50, G01N33/53, A61K48/00, A61P9/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

GenBank/EMBL/DDBJ/Geneseq,
WPI (DIALOG)、BIOSIS (DIALOG)、MEDLINE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Kumari, S. et al., Functional expression and biophysical properties of polymorphic variants of the human gap junction protein connexin37. Biochem Biophys Res Commun., Vol. 274(1), pp. 216-224 (2000)	1, 7, 10
Y	Dupont, E. et al., Altered connexin expression in human congestive heart failure. J Mol Cell Cardiol., Vol. 33(2), pp. 359-371 (2001)	1, 7, 10

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

08.07.03

国際調査報告の発送日

22.07.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田村 明 照

4 B

8 4 1 2

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Kumari, S. et al., Two polymorphic variants of human connexin37 exhibit different biophysical properties Mol. Biol. Cell, Vol. 9 Suppl., pp. 93a 538 (1998)	1, 7, 10
A	Reed, K. E. et al., Molecular cloning and functional expression of human connexin37, an endothelial cell gap junction protein. J. Clin. Invest., Vol. 91(3), pp. 997-1004 (1993)	1, 7, 10

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 4-6 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
人体の診断方法に係る発明が記載されている。
2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

（特別ページ参照）

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

請求の範囲1, 7, 10の(1)の多型に関する部分

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

(第II欄の続き)

請求の範囲に記載された(1)～(15)に記載された遺伝子の多型は、心筋梗塞のリスク診断に使用することができる点で共通している。

しかしながら、下記引用文献1～3にも記載されているように、アンジオテンシン変換酵素(ACE)の遺伝子多型、血小板糖蛋白レセプターの遺伝子多型、第VII血液凝固因子の遺伝子多型がそれぞれ心筋梗塞と関連していることが本出願前から公知である。したがって、遺伝子の多型が心筋梗塞のリスク診断に使用することができることはPCT規則13.2における特別な技術的特徴であるとはいえない。

ここで、PCT規則13.3によると、発明の単一性の判断はこれらの発明が別個の請求の範囲に記載されているか単一の請求の範囲に択一的な形式によって記載されているかを考慮することなく行われるべきものである。

よって、請求の範囲に記載された発明のうち、(1)～(15)に記載された遺伝子の多型に関する発明は、単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとはいえず、本出願は、(1)～(15)に記載された15種の遺伝子多型に対応する15個の発明を含むものと認められる。

文献1 : Cambien F. et al.,

Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction.

Nature, Vol. 359, No. 6396, pp. 641-644 (1992)

文献2 : Weiss, E. J. et al.,

A polymorphism of a platelet glycoprotein receptor as an inherited risk factor for coronary thrombosis.

N. Engl. J. Med., Vol. 334, No. 17, pp. 1090-1094 (1996)

文献3 : Iacovjello L. et al.,

Polymorphisms in the coagulation factor VII gene and the risk of myocardial infarction.

N. Engl. J. Med., Vol. 338, No. 2, pp. 79-85 (1998)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.